

Die mitochondriale Biogenese in *Saccharomyces cerevisiae*: Identifizierung und Charakterisierung neuer Komponenten der mitochondrialen Funktion und Morphogenese

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

– Doktor der Naturwissenschaften –

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften

der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Sandra Merz-Jakob

aus Luhe

Bayreuth 2009

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. Nat.)“.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2005 bis April 2009 an der Universität Bayreuth am Institut für Zellbiologie unter der Betreuung von Prof. Dr. Benedikt Westermann angefertigt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 29.04.09

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 28.09.09

Prüfungsausschuss:

Erstgutachter:	Prof. Dr. Benedikt Westermann
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Olaf Stemmann
Vorsitzender:	Prof. Dr. Stephan Clemens
	PD Dr. Martina Meyering-Vos
	Prof. Dr. Franz X. Schmid

Für Roman

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN.....	VIII
ZUSAMMENFASSUNG.....	X
SUMMARY.....	XII
 1 EINLEITUNG.....	 1
1.1 Hefe als Modellorganismus.....	1
1.2 Funktionen, Struktur und Ursprung von Mitochondrien.....	2
1.3 Die Atmungskette in <i>S. cerevisiae</i>	5
1.4 Die <i>pet</i> -Mutation in <i>S. cerevisiae</i>	7
1.5 Die mitochondriale Dynamik und ihre physiologische Bedeutung.....	7
1.6 Mitochondriale Fusion und Teilung in <i>S. cerevisiae</i>	9
1.6.1 Die mitochondriale Fusionsmaschinerie.....	10
1.6.2 Die mitochondriale Teilungsmaschinerie.....	11
1.7 Die mitochondriale Morphologiekomponente Mdm33.....	14
1.8 Zielsetzung.....	16
 2 MATERIALIEN UND METHODEN.....	 18
2.1 Molekularbiologische Methoden.....	18
2.1.1 Präparation von DNA.....	18
2.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	18
2.1.1.2 Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	19
2.1.1.3 Isolierung von DNA aus zellfreien Systemen.....	20
2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	21
2.1.3 Agarosegelelektrophorese.....	23
2.1.4 Klonierung von DNA-Fragmenten.....	24
2.1.4.1 Präparativer Restriktionsverdau.....	24
2.1.4.2 Dephosphorylierung.....	24
2.1.4.3 Ligation.....	24
2.1.4.4 Klonierung von <i>MSS2</i> und <i>COX16</i>	24
2.1.5 Übertragung von genetischem Material in <i>E. coli</i> -Zellen.....	25
2.1.5.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	25
2.1.5.2 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	25
2.1.6 Analytischer Restriktionsverdau.....	25
2.2 Methoden der Hefegenetik.....	26
2.2.1 Verwendete Hefestämme.....	26
2.2.2 Anzucht von Hefezellen.....	28
2.2.3 Wachstumsanalysen.....	28
2.2.3.1 Semiquantitative Wachstumstests zur Erfassung des <i>MDM33</i> - Überexpressionseffekts.....	28

2.2.3.2 Erfassung des Wachstumsverhaltens mittels Tüpfel-Test.....	29
2.2.3.3 Erfassung des Wachstumsverhaltens mit Wachstumskurven.....	29
2.2.4 Übertragung von genetischem Material in <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	29
2.2.4.1 Standard Hefetransformation und verwendete Plasmide.....	29
2.2.4.2 Übertragung mitochondrialer DNA durch Cytofusion.....	31
2.2.5 Komplementations-Test.....	32
2.2.6 Hefe Adaptionsversuch.....	32
2.2.7 Herstellung von Doppelmutanten.....	33
2.2.7.1 Herstellung diploider Stämme.....	33
2.2.7.2 Sporulation und Tetradendisektion.....	33
2.2.8 Herstellung von Glycerin-Stocks.....	34
2.3 Methoden der Zellbiologie.....	34
2.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Analysen.....	34
2.3.1.1 Anzucht von Hefezellen für die Fluoreszenzmikroskopie.....	34
2.3.1.2 Färbung subzellulärer Strukturen in <i>S. cerevisiae</i> für die Fluoreszenzmikroskopie.....	35
2.3.1.3 Fluoreszenzmikroskopie.....	36
2.3.2 Elektronenmikroskopie.....	37
2.3.2.1 Anzucht der Hefezellen für die Elektronenmikroskopie.....	37
2.3.2.2 Hefepräparation nach Bauer <i>et al.</i> (2001) und Einbettung von Hefezellen nach Spurr (1969).....	37
2.3.2.3 Trimmen, Schneiden und Nachkontrastierung.....	38
2.3.2.4 Elektronenmikroskopie.....	39
2.3.2.5 Befilmen von Kupfer-Lochgrids.....	39
2.4 Methoden der Proteinbiochemie.....	39
2.4.1 In vivo Markierung mitochondrialer Translationsprodukte.....	39
2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.4.3 Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulose-Membran (Western-Blot) und Autoradiographie.....	40
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	42
3.1 Genetische Basis von respiratorischem Wachstum, mitochondrialem Genom-Erhalt und mitochondrialer Proteinsynthese in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	42
3.1.1 Durchmusterung einer Hefedeletionsbibliothek nach Mutanten mit Wachstumsdefekt auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle.....	42
3.1.1.1 Vergleichende Gendeletionsanalyse.....	42
3.1.1.2 Aussagekraft der Ergebnisse.....	45
3.1.2 Charakterisierung der identifizierten <i>pet</i> -Stämme durch funktionelle Tests....	46
3.1.2.1 Wiedergewinnung der respiratorischen Aktivität durch Kreuzung mit $\Delta mip1$ und/oder Cytofusion.....	48
3.1.2.2 Gene, die für den Erhalt der mtDNA benötigt werden.....	50

3.1.2.3 Gene, die für die mitochondriale Proteintranslation benötigt werden...	53
3.1.2.4 Andere Gene mit Bedeutung für die Respiration.....	58
3.1.2.5 Neue Komponenten, die essentiell für die respiratorische Kompetenz sind.....	59
3.1.2.6 Der Einfluss extragenomischer Faktoren.....	62
3.1.3 Funktionelle Untersuchung der COX-Assemblierungs-Mutanten.....	64
3.1.3.1 Plasmidale Komplementation der Gendeletion.....	64
3.1.3.2 Der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	67
3.1.3.3 Modell zur Entstehung der respiratorischen Inkompetenz in den COX-Assemblierungs-Mutanten.....	71
3.2 Studien zur mitochondrialen Morphogenese.....	75
3.2.1 Identifizierung von Wechselwirkungspartnern der mitochondrialen Innenmembranteilungskomponente Mdm33.....	75
3.2.1.1 Beurteilung des Wachstums bei Überexpression von <i>MDM33</i>	76
3.2.1.2 Mitochondriale Morphologie bei Überexpression von <i>MDM33</i>	80
3.2.2 Untersuchung der <i>MDM33</i> -überexpressionstoleranten Stämme mit partielltem Erhalt von Wildtypmitochondrien.....	87
3.2.2.1 Besteht ein Zusammenhang zwischen der Kompensation des über- expressionsspezifischen Wachstums- und Mitochondriendefekts?.....	87
3.2.2.2 Bioinformatische Analysen und Datenbankrecherchen.....	88
3.2.2.3 Funktionelle Charakterisierung.....	89
3.2.2.4 Elektronenmikroskopische Erfassung der mitochondrialen Innen- membranstruktur ohne und mit Überexpression von <i>MDM33</i>	92
3.2.3 Untersuchung des Einflusses von Mdm33 auf die mitochondriale Außenmembranteilungsmaschinerie.....	96
3.2.3.1 Quantitative Erfassung der mitochondrialen Morphologie.....	97
3.2.3.2 Quantifizierung von Dnm1-GFP-Punkten.....	98
4 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	103
4.1 Genetische Basis von respiratorischem Wachstum, mitochondrialem Genom-Erhalt und mitochondrialer Proteinsynthese in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	103
4.1.1 Identifizierung und Charakterisierung von Mutanten mit Wachstumsdefekt auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle.....	103
4.1.2 Der <i>pet</i> -Phänotyp in den COX-Assemblierungs-Mutanten Δcox10 , Δcox16 , Δcox19 und Δmss2	107
4.2 Studien zur mitochondrialen Morphogenese.....	108
4.2.1 Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von Wechselwirkungs- partnern der mitochondrialen Innenmembranteilungskomponente Mdm33....	108
4.2.2 Der Einfluss von Mdm33 auf die mitochondriale Außenmembranteilungs- maschinerie.....	111
5 LITERATURVERZEICHNIS.....	114
6 ANHANG.....	124
DANKSAGUNG	163
ERKLÄRUNGEN.....	164

Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
AM	mitochondriale Außenmembran
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
CC	Coiled-coil-Domäne
CL	Cardiolipin
CM	Cristaemembran
COX	Cytochrom c Oxidase
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DHR	Dihydrorhodamin-123
DIC	Differential-Interferenz-Kontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dnm1-GFP	Fusionsprotein aus Dnm1 und GFP
EB-Puffer	Elutionspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
5-FOA	5'Fluororotsäure
G418	Geneticin-Disulfat
GED	GTPase-Effektordomäne
IBM	<i>inner boundary membrane</i>
IM	mitochondriale Innenmembran
IMR	mitochondrialer Intermembranraum
LB	<i>lysogeny broth</i> bzw. Luria-Bertani-Medium (<i>E. coli</i> -Nährlösung)
mt	mitochondrial
mtDNA	mitochondriale DNA
mtGFP	Fusionsprotein aus GFP und mitochondrialer Präsequenz
mtRFP	Fusionsprotein aus RFP und mitochondrialer Präsequenz
NBD	<i>nucleotide binding domain</i>
NSA	Nonenylsuccinicanhydrid
NTE	<i>N-terminal extension</i>
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i>
p. a.	<i>pro analysis</i> ; für die Analyse
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
<i>pet</i>	<i>petite</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PPR	<i>pentatricopeptid repeat</i>
Q	Coenzym Q, Ubichinon
$[\rho^0]$	kompletter Verlust der mtDNA
$[\rho^+]$	intakte mtDNA
$[\rho]$	partieller Verlust der mtDNA durch Mutationen oder Deletionen
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reactive Sauerstoffspezies)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD/SGal/SR	Minimalselektivmedium mit Glukose, Galaktose oder Raffinose als Kohlenstoffquelle
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors</i>
ssCarrierDNA	Lachsspermien DNA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris/Borat/EDTA-Puffer

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TCA	Trichloressigsäure
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembrandomäne
T _m	Schmelzpunkt von Oligonukleotiden
TPR	<i>tetratricopectid repeat</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)- propan-1,3-diol
üN	über Nacht
WT	Wildtyp
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
yfg	<i>your favourite gene</i>
YPD/YPG/YPGal	Hefenährmedium aus Hefeextrakt und Pepton mit Glukose, Glyzerin oder Galaktose als Kohlenstoffquelle

ZUSAMMENFASSUNG

Deletionsbibliotheken sind heutzutage ein wertvolles Werkzeug, um Genfunktionen zu entschlüsseln und das Verständnis zellulärer Abläufe zu komplettieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ausgehend von der ~4800 Deletionsmutanten nicht-essentieller Hefegene umfassenden *MAT α* -Deletionsbibliothek *large-scale* Analysen durchgeführt, um das Verständnis zweier wichtiger Teilbereiche der mitochondrialen Biogenese zu erweitern, nämlich (1) dem Erhalt der Atmungsfähigkeit und (2) der mitochondriale Teilung als zentraler Bestandteil der Morphogenese.

Die Biogenese der Atmungskette erfordert die koordinierte Expression des Kerngenoms und des mitochondrialen Genoms, wobei im Zellkern der Großteil der mitochondrialen Proteine kodiert wird und die mitochondriale DNA (mtDNA) nur wenige Gene enthält. Im ersten Teilabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde ein systematischer, genomweiter Screen durchgeführt, um den Satz an kernkodierten Genen zu ermitteln, der für die respiratorische Aktivität sowie den Erhalt und die Expression der mtDNA in Hefe erforderlich ist. Durch vergleichende Gendeletionsanalysen konnte eine unerwartet große phänotypische Plastizität festgestellt werden. Darüber hinaus wurden zehn bisher uncharakterisierte Gene identifiziert, die essentiell für den Erhalt des respiratorischen Wachstums sind (*RRG1* bis *RRG10*). Systematische funktionelle Analysen der 319 respiratorisch inkompetenten Mutanten enthüllten 16 Gene, die essentiell für den Erhalt mitochondrialer DNA sind, 88 Gene, die für die allgemeine mitochondriale Proteintranslation benötigt werden, und zehn Gene, die für die Expression bestimmter mitochondrialer Genprodukte erforderlich sind. In einer Gruppe von 23 Mutanten spielen vermutlich auch extragenomische Faktoren eine Rolle für mitochondriale Funktionen. Darunter waren vier Deletionsstämme mit fehlerhafter Assemblierung der Cytochrom *c* Oxidase. Diese akkumulieren verstärkt reaktive Sauerstoffspezies (ROS), was zu einer schnelleren Alterung führt. Insgesamt verbessern die gewonnenen Daten das Verständnis der molekularen Prozesse, die zum Erhalt der mtDNA, zur mitochondrialen Proteintranslation und zur Assemblierung der Atmungskette beitragen. Sie deckten mehrere bisher uncharakterisierte Komponenten auf und liefern ein umfassendes Bild der molekularen Prozesse, die für die respiratorische Kompetenz in einer relativ einfachen eukaryotischen Zelle benötigt werden.

Die zentrale Bedeutung der Mitochondrien in der Zelle beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Atmungsfähigkeit. Mitochondrien sind vielmehr wichtige Bestandteile zahlreicher

physiologischer Prozesse, deren Funktionalität maßgeblich von der mitochondrialen Dynamik, insbesondere der Fusion und Teilung, abhängt. Der zweite Teilabschnitt der Arbeit beschäftigte sich deshalb mit der mitochondrialen Teilung. Mdm33, ein integrales Innenmembranprotein der Hefemitochondrien, ist die bisher einzige bekannte Komponente der Innenmembranteilung. Seine Überexpression bedingt eine mitochondriale Fragmentierung, die mit einem starken Wachstumsdefekt einher geht. Mögliche Wechselwirkungspartner waren nicht bekannt. Deshalb wurde ein genetischer Screen durchgeführt, um direkte oder indirekte Wechselwirkungspartner von Mdm33 zu identifizieren. *MDM33* wurde in einer Auswahl von 164 Hefedeletionsmutanten überexprimiert, in denen vor allem mitochondrial lokalisierte Proteine fehlten. Anhand der Kriterien Wachstumsfähigkeit und blockierte mitochondriale Fragmentierung bei Überexpression von *MDM33* wurden sieben bisher uncharakterisierte genetische Interaktionspartner identifiziert, die möglicherweise mit Mdm33 funktionell wechselwirken. Dnm1 und Mdv1 sind Komponenten der mitochondrialen Außenmembranteilungsmaschinerie. Die Detektion der Deletionsstämme $\Delta dnm1$ und $\Delta mdv1$ im Screen als *MDM33*-überexpressions-tolerant weist auf eine Funktion der Außenmembranteilungsmaschinerie bei der Entstehung des *MDM33*-Überexpressionsphänotyps hin und zeigt gleichzeitig, dass die Funktion von Mdm33 *upstream* der Außenmembranteilungsmaschinerie liegt. Dnm1 kann auch in Abwesenheit von Mdm33 auf der mitochondrialen Oberfläche assemblieren. Die Mdm33-abhängige Modulation der Teilungsaktivität erfolgt also nicht durch eine verhinderte Assemblierung, sondern wahrscheinlich durch eine veränderte Aktivierung der Außenmembranteilungsmaschinerie. Diese Ergebnisse liefern weitere Einblicke in den Zusammenhang zwischen der Mdm33-Funktion und der Außenmembranteilungsmaschinerie und untermauern damit die Gültigkeit des bestehenden Mdm33-Wirkmodells, in dem Mdm33 als Voraussetzung für die Außenmembranteilung die Innenmembranteilung/Einschnürung des Mitochondrientubulus vermittelt. Damit wurde ein weiterer Schritt zur Komplettierung des Bilds der mitochondrialen Teilungsmaschinerie getan.

SUMMARY

Today deletion libraries are very valuable tools to decipher gene functions and to increase the knowledge about cellular processes. Based on the *MAT α* -yeast deletion library, which covers ~4800 deletion mutants of non-essential genes, the present work was aimed at large-scale analyses to further the understanding of two important processes of mitochondrial biogenesis: (1) maintenance of respiratory competence and (2) mitochondrial fission as a part of morphogenesis.

Biogenesis of the respiratory chain requires the coordinated expression of the nuclear and the mitochondrial genomes, while the nucleus encodes the vast majority and the mtDNA only a few of the mitochondrial proteins. In the first part of this work, a systematic genome-wide screen was conducted to identify the complete set of nuclear-encoded genes that are essential for respiratory activity, mitochondrial gene expression and mitochondrial genome maintenance. Comparative gene deletion analysis revealed an astonishing phenotypic plasticity. Furthermore ten hitherto uncharacterized genes (*RRG1* to *RRG10*) were found to be essential for maintenance of respiratory competence. Systematic functional analysis of all of the identified 319 respiratory-deficient mutants disclosed 16 genes essential for maintenance of mtDNA, 88 genes important for mitochondrial protein synthesis, and ten genes required for expression of specific mitochondrial gene products. In a group of 23 mutants, extra-genomic factors are presumably important for maintenance of respiratory activity. Among these were four deletion mutants with impaired assembly of cytochrome *c* oxidase, which accumulated reactive oxygen species (ROS) rendering the mutants more sensitive to ageing. Taken together, these data contribute to the understanding of the molecular processes involved in mtDNA maintenance, mitochondrial protein synthesis and assembly of the respiratory chain. They revealed a number of so far uncharacterized components and provide a comprehensive picture of the molecular processes required for respiratory competence in a relatively simple eukaryotic cell.

The central role of mitochondria within the cell is not exclusively related to respiratory competence. In fact, mitochondria are major players of many physiological processes and their functionality depends on the mitochondria's highly dynamic nature, in particular on fusion and fission. Thus, the second part of the present work focused on mitochondrial fission. Mdm33, an integral inner membrane protein of yeast mitochondria, is the only known

player of mitochondrial inner membrane fission. Its overexpression leads to mitochondrial fragmentation, accompanied by a severe growth defect. Possible interaction partners of Mdm33 are currently unknown. Therefore a genetic screen was conducted to identify direct or indirect interaction partners of Mdm33. *MDM33* was overexpressed in a deletion mutant collection covering 164 non-essential genes of *Saccharomyces cerevisiae* encoding mitochondria-localized proteins. Seven so far uncharacterised genetic interaction partners were identified which possibly functionally interact with Mdm33 as deletion of the respective genes restored growth and blocked mitochondrial fragmentation in the presence of excess Mdm33. Dnm1 and Mdv1 are components of the mitochondrial outer membrane fission machinery. Detection of the deletion strains $\Delta dnm1$ and $\Delta mdv1$ as *MDM33* overexpression-tolerant demonstrates the contribution of the outer membrane fission machinery to the development of the *MDM33* overexpression phenotype. At the same time, it shows that Mdm33 influences fission activity upstream the outer membrane fission machinery. In the absence of Mdm33 Dnm1 is still able to assemble on the mitochondrial surface. Thus, the Mdm33-dependent modulation of fission activity does not result from inhibited assembly, but rather from an altered activation of the outer membrane fission machinery. These results provide further insights into the connection between Mdm33 function and the outer membrane fission machinery. They confirm the current hypothesis on Mdm33 function, which proposes Mdm33 to mediate fission of the inner membrane and/or constriction of the mitochondrial tubule as a prerequisite of outer membrane fission. Taken together, these data contribute to an understanding of mitochondrial fission machinery.

1 EINLEITUNG

Seit der Entdeckung von Mitochondrien vor mehr als 100 Jahren durch Kölliker *et al.* wurden stetig neue Erkenntnisse über diese lebenswichtigen Organellen gewonnen: Sie wurden als Ort zahlreicher metabolischer Grundprozesse und der Energiegewinnung charakterisiert (zusammengefasst in Scheffler, 2001; Lill & Mühlenhoff, 2005). Strukturelle Eigenschaften, wie das Vorliegen von mitochondrialer DNA (mtDNA; Nass & Nass, 1963), Doppelmembranen und Cristae, wurden geklärt (Palade, 1952; Perkins *et al.*, 1997) und nicht zuletzt konnte eine beeindruckende Dynamik gezeigt werden (Bereiter-Hahn, 1990; Nunnari *et al.*, 1997; Okamoto & Shaw, 2005), die von großer physiologischer Bedeutung ist (Westermann, 2008). Dabei wurde das grundlegende Verständnis von Mitochondrien in den letzten Jahren zunehmend durch Fortschritte in der Strukturbiologie beschleunigt. Zum einen lieferten Durchbrüche in der Röntgenstrukturanalyse beispielsweise Details der Atmungskette auf atomarem Level. Zum anderen ermöglichten Weiterentwicklungen in der Lichtmikroskopie, von Fluoreszenzfarbstoffen und im genetischen *engeneering* (speziell GFP-Fusionsproteine) die detaillierte Erfassung von Mitochondrien in lebenden Zellen (Frey & Mannella, 2000). Durch den Zusammenhang mitochondrialer Fehlfunktionen mit zellulärer Alterung und der Entstehung von Krankheiten, wie z. B. Parkinson und Alzheimer, rückten Mitochondrien weiter in den Fokus der Forschung (Schapira, 2006; Schapira, 2008). Dennoch sind auch heute noch nicht alle Aspekte des mitochondrialen Funktions- und Morphologieerhalts verstanden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit diesen beiden Teilbereichen und ihrem funktionellen Zusammenhang.

1.1 Hefe als Modellorganismus

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ist ein einzelliger, eukaryotischer Organismus, der dem Stamm der Ascomyceten angehört. Hefezellen können sowohl haploid (*MATa* oder *MAT α*) als auch diploid (*MATa/ α*) existieren, wobei diploide Zellen durch Verschmelzung Haploider entstehen. Beide Stadien vermehren sich vegetativ über Knospung. Darüber hinaus bilden diploide Hefezellen unter schlechten Lebensbedingungen über Meiose haploide Sporen aus. Diese sind als Tetraden im sogenannten Ascus organisiert und keimen erneut zu haploiden Zellen, sobald sich die Bedingungen verbessern (Herskowitz, 1988; Kassir *et al.*, 2003).

Viele Eigenschaften machen Hefe zu einem wertvollen Modellsystem, mit dem grundlegende zelluläre Prozesse untersucht werden können. Hefezellen sind leicht kultivierbar, besitzen eine kurze Generationszeit von nur etwa zwei Stunden und können bei -80°C jahrelang stabil gelagert werden. Darüber hinaus ist seit 1996 das etwa 12 Millionen bp große Hefegenom vollständig sequenziert (Goffeau *et al.*, 1996). Zusammen mit der leichten Manipulierbarkeit des Genoms durch gezielte Insertion, Deletion und Mutation ermöglicht dies eine effektive Untersuchung von Funktionen einzelner Gene oder ganzer zellulärer Abläufe. Da hohe Homologien zwischen *S. cerevisiae* und höheren Eukaryoten bestehen (46% der humanen Proteine besitzen Homologe in Hefe), lassen sich daraus gewonnene Informationen auch auf die komplexen, mehrzelligen Organismen übertragen (Foury & Kucej, 2002; Lander *et al.*, 2001).

Besonders die Mitochondrienforschung wird durch die Bäckerhefe erleichtert. *S. cerevisiae* ist fakultativ anaerob und dadurch in der Lage, ihren Energiebedarf ausschließlich über ATP aus der Fermentation zu decken (Tzagoloff & Dieckmann, 1990). Auch wenn O₂ zur Verfügung steht, erzeugen Hefen ihr ATP primär über die Glykolyse mit Ethanol als Fermentationsendprodukt. Die meisten respiratorischen Funktionen sind unter diesen Bedingungen über Katabolitrepession unterdrückt (Gancedo, 1998). Oxidative Phosphorylierung und mitochondriale DNA sind also verzichtbar, solange fermentierbare Kohlenstoffquellen, wie Glukose oder Fruktose, vorliegen. Erst wenn fermentierbare Kohlenstoffquellen begrenzt sind, werden Gene, die für die Atmung benötigt werden, induziert, und ATP wird durch die Verwertung nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquellen wie Glycerin, Laktat oder Ethanol erzeugt (Johnston, 1999; Piskur *et al.*, 2006). Deshalb ist Hefe ein idealer Modellorganismus, um Mechanismen zu untersuchen, die für den Erhalt der respiratorischen Kompetenz oder die mitochondriale Morphogenese benötigt werden.

1.2 Funktionen, Struktur und Ursprung von Mitochondrien

Mitochondrien sind essentielle, semiautonome Organellen, die in fast allen eukaryotischen Zellen vorkommen. Sie sind der primäre Ort der zellulären Energiegewinnung (Atmungskette; vgl. 1.3) und beherbergen zahlreiche Stoffwechselprozesse des Intermediärmetabolismus (Citratzyklus, Harnstoffzyklus, β -Oxidation von Fettsäuren, Häm-Biosynthese sowie Teile des Lipid- und Aminosäuremetabolismus) (Scheffler, 2001; Sickmann *et al.*, 2003). In Mitochondrien wird die Biogenese und Assemblierung von Fe/S-Clustern eingeleitet, was ihren essentiellen Charakter auch in fakultativ anaeroben Organismen, wie *S. cerevisiae*, erklärt (Lill & Mühlenhoff, 2005). In den letzten Jahren wurde

zudem eine enge Verknüpfung der Mitochondrien mit dem programmierten Zelltod (Green & Reed, 1998; Perfettini *et al.*, 2005) und mit zellulären Alterungsprozessen (Balaban *et al.*, 2005) deutlich.

Die räumliche Trennung der diversen mitochondrialen Funktionen wird durch den Aufbau des Organells erreicht. Mitochondrien sind von zwei Membranen umgeben, der mitochondrialen Außenmembran (AM) und der mitochondrialen Innenmembran (IM). Der enge Raum zwischen den beiden Membranen wird als Intermembranraum (IMR) bezeichnet. Die Innenmembran umschließt den proteinreichen Matrixbereich (M) und besitzt zur Oberflächenvergrößerung Einstülpungen (Cristae), die in den Matrixraum hineinragen. Dabei sind die Cristae keine zufälligen Faltungen, sondern tubuläre oder lamellare Mikrokompimente, die durch enge tubuläre Segmente, die sogenannten *cristae junctions* (10-15 nm), in die periphere Region der Membran münden (Perkins *et al.*, 1997; Mannella, 2008). Die parallel zur Außenmembran verlaufende Innenmembran, die als *inner boundary membrane* (IBM) bezeichnet wird, und die Cristae Membranen (CM) sind zwei Subkompartimente mit unterschiedlicher Proteinausstattung (Vogel *et al.*, 2006; Wurm & Jakobs, 2006). Insgesamt lassen sich also fünf mitochondriale Reaktionsräume unterscheiden (AM, IMR, IBM, CM, M).

Das Vorliegen zweier mitochondrialer Membranen kann durch die evolutionäre Geschichte des Organells erklärt werden. Heute geht man davon aus, dass Mitochondrien durch endocytotische Aufnahme eines α -Proteobakteriums in eine primitive prä-eukaryontische Zelle entstanden sind (=Endosymbiontentheorie; Gray *et al.*, 1999). Parallelen zwischen der mitochondrialen elektronentransportgekoppelten ATP-Produktion und der α -proteobakteriellen Energiegewinnung sowie phylogenetische Analysen untermauern die Verwandtschaft mit diesen Bakterien (Yang *et al.*, 1985; Gray *et al.*, 2001). Ein weiteres zwingendes Argument für die Endosymbiontentheorie ist die Existenz eigener mitochondrialer DNA (mtDNA) (Nass & Nass, 1963; Gray & Doolittle, 1982) und eines eigenständigen Transkriptions- und Translationsapparats (Attardi & Schatz, 1988; Lecrenier & Foury, 2000; Kelly & Scarpulla, 2004). Aufgrund fortschreitenden Gentransfers wurde im Laufe der Evolution beinahe das gesamte mitochondriale Genom in den Zellkern integriert (Adams & Palmer, 2003; Timmis *et al.*, 2004). Der Großteil des mitochondrialen Proteoms (~1000 Proteine in Hefe; Comprehensive Yeast Genome Database CYGD; Güldener *et al.*, 2005) ist deshalb kernkodiert, wird cytosolisch synthetisiert und posttranslational über die membranständigen Transportkomplexe in das Organell importiert (Pfanner *et al.*, 2004; Reichert & Neupert, 2004). Rezente mitochondriale Genome enthalten somit neben tRNA-

und rRNA-kodierenden nur noch eine sehr begrenzte Anzahl an proteinkodierenden Genen (13 im Menschen und 8 in *S. cerevisiae*; Grivell, 1995; Gray *et al.*, 1999). Ihre Produkte sind einige Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe und in manchen Organismen Komponenten, die für die Synthese und Assemblierung von mitochondrial kodierten Proteinen benötigt werden (Gray *et al.*, 1999). In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* sind die Atmungskettenkomponenten-Untereinheiten Atp6, Atp8, Atp9, Cob, Cox1, Cox2 und Cox3 sowie das mitochondriale Ribosomenprotein Var1 mitochondrial kodiert (Towpik, 2005). Auch wenn die Anzahl der mitochondrialen Genprodukte begrenzt ist, sind sie aufgrund ihrer katalytischen Funktionen in Elektronentransport und oxidativer Phosphorylierung essentiell für die Ausbildung respiratorischer Kompetenz (Tzagoloff & Dieckmann, 1990). Um diese Handvoll an Genen zu exprimieren, synthetisiert die Zelle mehr als 200 kernkodierte Proteine, die für die Expression und den mtDNA-Erhalt benötigt werden (Grivell *et al.*, 1999; Sickmann *et al.*, 2003). Die Biogenese der Atmungskette erfordert also die koordinierte Expression des Kern- und des mitochondrialen Genoms.

Die zirkuläre mtDNA liegt nicht als nacktes Molekül vor, sondern ist in Nukleoproteinpartikel organisiert. In Analogie zu DNA-Strukturen prokaryotischer Zellen werden diese Organisationseinheiten als Nukleoide bezeichnet. In Hefezellen liegen pro Zelle ~20 Nukleoide vor, die etwa 400 nm groß sind und ein bis zwei Kopien der 80 kbp-großen DNA-Moleküle enthalten. Nukleoide bestehen in den meisten Organismen aus mehr als 25 verschiedenen Proteinen. Interessanterweise sind neben DNA-bindenden Proteinen der HMG¹-Box-Familie und solchen, die für die Transkription verantwortlich sind, auch metabolische Enzyme verschiedener Funktionen enthalten (z.B. Aconitase (Aco1) und Ilv5²). Möglicherweise ist so eine gezielte Kopplung zwischen mtDNA-Erhalt bzw. -Restrukturierung und metabolischen Veränderungen möglich (Kucej & Butow, 2007). Für die zielgerichtete Vererbung mitochondrialer mtDNA wird ein membrandurchspannender Komplex postuliert, der die Außenmembranproteine Mmm1, Mdm10 und Mdm12 enthält. Vermutlich wird dadurch, unter Beteiligung noch unbekannter Proteine in der Innenmembran, eine Verknüpfung zwischen mtDNA und dem Cytosol hergestellt, was wiederum eine Verbindung zum Aktin-Cytoskelett ermöglichen könnte (Hobbs *et al.*, 2001; Boldogh *et al.*, 2003). Sowohl die exakte Zusammensetzung von Nukleoiden, der Einfluss sekundärer Wege (Transkription) auf den mtDNA-Erhalt als auch die gezielte Vererbung von mtDNA sind bis heute jedoch nicht voll verstanden (Kucej & Butow, 2007).

¹ HMG-Box (*high mobility group*): DNA-bindende Domäne von 70-80 Aminosäuren

² *IsoLeucine-plus-Valine requiring*; Acetohydroxyacid Reduktoisomerase: beteiligt an der Biosynthese verzweigter Aminosäuren (Zelenaya-Troitskaya *et al.*, 1995)

1.3 Die Atmungskette in *S. cerevisiae*

Die oxidative Phosphorylierung ist das Kernstück des Energiemetabolismus in Tieren, Pflanzen und in vielen anderen mikrobiellen Lebensformen (Frey & Mannella, 2000). Die in der mitochondrialen Cristaemembran lokalisierte Atmungskette (Komplex I bis IV) koppelt hierfür den sequentiellen Elektronentransfer (von NADH/FADH₂ auf den terminalen e⁻-Akzeptor O₂) mit einer Protonentranslokation. Dadurch entsteht eine protonenmotorische Kraft (*proton motive force*; *pmf*), die als Triebkraft der Phosphorylierung von ADP zu ATP durch die F₁F₀-ATPase (Komplex V) dient (chemi-osmotische Kopplung). Die klassische Elektronentransportkette in Tieren besteht aus vier hochmolekularen Oxidoreduktase-Komplexen – NADH-Dehydrogenase (Komplex I), Succinat-Dehydrogenase (Komplex II; Sdh), Cytochrom *bc*₁-Komplex (Komplex III; *bc*₁) und Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV; COX) – sowie zwei mobilen Komponenten, Ubichinon (Q) und Cytochrom *c* (C). In *S. cerevisiae* liegt kein Komplex I vor. Dieser ist durch drei rotenoninsensitive, alternative NADH-Dehydrogenasen – Ndi1, Nde1 und Nde2 – ersetzt, die jeweils nur aus einer Aminosäurekette bestehen und keine Protonen translozieren (Joseph-Horne *et al.*, 2001; Herrero *et al.*, 2008; siehe auch Abb. 1-1). Ndi1 (*NADH dehydrogenase internal*) befindet sich an der matrixorientierten Seite der mitochondrialen Innenmembran und sorgt für die Verwertung mitochondrial produzierten NADHs aus dem Citratzyklus (Marres *et al.*, 1991). Die aktiven Zentren der äußeren NADH-Dehydrogenasen Nde1 und Nde2 (*NADH dehydrogenase external*) weisen in den Intermembranraum, wo sie cytosolisches NADH aus der Glykolyse oxidieren (Overkamp *et al.*, 2000). Darüber hinaus scheinen sie primär an der Atmung während des Wachstums mit Ethanol beteiligt zu sein (Davidson & Schiestl, 2001). Cytosolisches NADH aus der Glykolyse kann zudem über den Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase-Shuttle in der Atmungskette oxidiert werden. Der Shuttle besteht aus cytosolischen NADH-abhängigen Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenasen (Gpd1/2) und einer membrangebundenen Glycerin-3-Phosphat:Ubichinon-Oxidoreduktase (Gut2) (Larsson *et al.*, 1998). Alle bekannten Wege der respiratorischen NADH oder FADH₂-Oxidation in *S. cerevisiae* laufen über den Ubichinon-Pool (Herrero *et al.*, 2008).

Als unvermeidliches Nebenprodukt der Atmungskette entstehen immer reaktive Sauerstoffspezies (ROS; *reactive oxygen species*), indem Elektronen an Zwischenschritten der Atmungskette austreten und Sauerstoff monoelektronisch reduzieren (Boveris & Chance, 1973). So werden schätzungsweise 1-5% des während der oxidativen Phosphorylierung verbrauchten Sauerstoffs in ROS umgesetzt (Chan, 2006). In Hefemitochondrien werden etwa

die Hälfte der ROS durch die beiden äußeren NADH-Dehydrogenasen Nde1 und Nde2 gebildet, die andere Hälfte entsteht, wie bei höheren Eukaryoten, an Komplex III (Fang & Beattie, 2003; Herrero *et al.*, 2008; vgl. Abb. 1-1). ROS (v. a. das durch die Fenton-Reaktion entstehende Hydroxylradikal HO^\bullet) sind hochreaktive Moleküle, die Proteine, Lipide, DNA und RNA modifizieren und dadurch zelluläre Dysfunktionen induzieren können (Semenza, 2007; Hoye *et al.*, 2008). Viele dieser Dysfunktionen stehen in Zusammenhang mit Alterung und degenerativen Krankheiten (Shigenaga *et al.*, 1994; Schapira, 2006; Hiona & Leeuwenburgh, 2008). Um radikalbedingte Schädigung zu verhindern, existieren zelluläre Abwehrmechanismen, die die Funktion von Enzymen (Superoxiddismutasen Sod1 und Sod2, Catalasen und Peroxidasen) und kleiner Antioxidantien, wie Glutathion, erfordern (Jamieson, 1998; Herrero *et al.*, 2008). Das antioxidative System arbeitet allerdings nur in begrenztem Maße, sodass immer eine Mindestmenge an ROS freigesetzt wird. Die Entwicklung von Schädigungen schreitet verstärkt voran, wenn aufgrund von Fehlfunktionen die ROS-Produktion die Entgiftungsrate übersteigt.

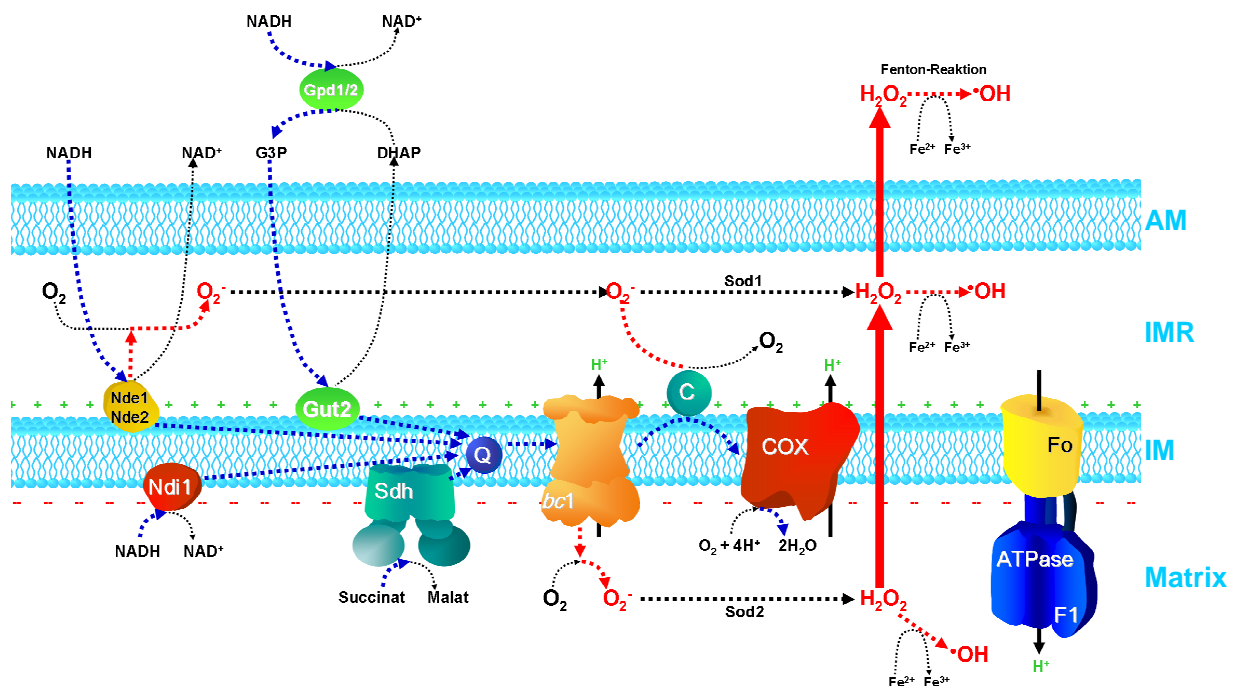


Abbildung 1-1: Atmungskette und Orte der ROS-Produktion in *S. cerevisiae*. Der reguläre Weg der Elektronen in der Atmungskette ist blau dargestellt. Rote Pfeile kennzeichnen die Fehlleitung von Elektronen im Zuge der ROS-Produktion. AM: mitochondriale Außenmembran; ATPase: ATP-Synthase, bestehend aus F_0 - und F_1 -Teil; bc1: Cytochrom bc_1 -Komplex; C: Cytochrom c; COX: Cytochrom c Oxidase; Gpd1/2: Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase; Gut2: Glycerin-3-Phosphat:Ubichinon-Oxidoreduktase; IMR: Intermembranraum; IM: mitochondriale Innenmembran; NAD: Nicotinamidadenindinukleotid; Nde1/2: NADH dehydrogenase external; Ndi1: NADH dehydrogenase internal; Q: Ubichinon; Sdh: Succinat-Dehydrogenase; Sod1/2: Superoxiddismutase.

1.4 Die *pet*-Mutation in *S. cerevisiae*

Hefemutanten mit Defekten in der oxidativen Phosphorylierung sind nicht in der Lage auf Medien mit ausschließlich nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen. Auf Medium mit begrenzter Menge an fermentierbarer Kohlenstoffquelle erzeugen diese Mutanten kleinere Kolonien als der Wildtyp. Dieser charakteristische Phänotyp wird mit dem Begriff *petite* (*pet*) beschrieben (Ephrussi *et al.*, 1949). Grundsätzlich werden zwei Typen an *petite*-Mutanten unterschieden: Cytoplasmatische *petites* sind Mutanten mit mtDNA-bedingtem Defekt (entweder mit großen Deletionen in der mitochondrialen DNA [*rho*⁻] oder komplettem Verlust der mtDNA [*rho*⁰]) und respiratorisch-defiziente Stämme, die die ursächlichen Mutationen in ihrem Kerngenom aufweisen, werden als nukleäre *petites* bezeichnet (Tzagoloff & Dieckmann, 1990). Nukleäre *pet*-Gene kodieren unter anderem für Atmungskettenkomponenten, für Faktoren, die die Faltung und Assemblierung von Atmungskettenuntereinheiten ermöglichen, für Proteine, die für den mtDNA-Erhalt, mitochondriale RNA- und Proteinsynthese benötigt werden, und für Komponenten, die der mitochondrialen Morphologiemaschinerie zuzuordnen sind (Tzagoloff & Dieckmann, 1990; Contamine & Picard, 2000; Dimmer *et al.*, 2002). Im weiteren Text werden sowohl cytoplasmatische als auch nukleäre *petite*-Mutanten als *pet*-Mutanten bezeichnet. Auch wenn durch klassische genetische Methoden und genomweite Durchmusterungen bereits viele *pet*-Gene identifiziert wurden (Tzagoloff & Dieckmann, 1990; Contamine & Picard, 2000; Dimmer *et al.*, 2002), sind die genauen Zusammenhänge und Einflüsse, die für die Entstehung eines *pet*-Phänotyps entscheidend sind, auch heute noch nicht voll verstanden.

1.5 Die mitochondriale Dynamik und ihre physiologische Bedeutung

Mitochondrien sind – anders als in vielen Lehrbüchern dargestellt – keine statischen Objekte. Vielmehr unterliegen sie ständiger morphologischer Veränderung, die durch den koordinierten Ablauf von Fusion, Teilung und Bewegung entlang des Cytoskeletts erreicht wird (Bereiter-Hahn, 1990; Nunnari *et al.*, 1997; Okamoto & Shaw, 2005). Durch diese Modulation erfolgt eine Anpassung an die jeweiligen physiologischen Bedingungen, sodass Mitochondrien ihre zahlreichen zellulären Funktionen zielgerichtet erfüllen können. In metabolisch aktiven Hefezellen bilden Mitochondrien ein verbundenes Retikulum unter dem Zellkortex aus (Hoffman & Avers, 1973; Stevens and White, 1979). Dabei wird eine morphologische Adaption an die Wachstumsphase oder die verwertbare Kohlenstoffquelle beobachtet. In der stationären Phase liegen stark verkürzte Tubuli vor, die in logarithmisch

wachsenden Zellen zu einem verbundenen Netzwerk fusionieren. Der Grad der Verzweigung ist dabei von der respiratorischen Aktivität und damit der Nährstoffquelle abhängig. Auf fermentierbarer Kohlenstoffquelle (z. B. Glukose) ist das Netzwerk mäßig verzweigt (vgl. Abb. 1-2), da Glukose zum Großteil über alkoholische Gärung verwertet wird. Aufgrund der erhöhten respiratorischen Aktivität wird auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (z. B. Glycerin) mehr Mitochondrienmasse in stark verzweigter Form gebildet (Egner *et al.*, 2002). Die mitochondriale Fusion ist Grundvoraussetzung für die Ausbildung eines solchen durchgehenden Netzwerks. Dieses stellt eine elektrische Einheit dar, sodass Membranpotential von O₂-reichen auf O₂-arme Bereiche übertragen werden kann. Dadurch wird die effiziente Energieversorgung der gesamten Zelle ermöglicht (Skulachev, 2001). Auch für die Übertragung von Calcium-Signalen sind mitochondriale Netzwerke im Zusammenspiel mit dem Endoplasmatischen Retikulum von großer Bedeutung (Szabadkai *et al.*, 2006). Die Fusion bietet zudem einen effektiven Schutzmechanismus gegen mtDNA-Schädigungen, die z. B. durch ROS entstehen. Durch die Vereinigung und Durchmischung des mitochondrialen Kompartiments kann eine Komplementation von mtDNA-Genprodukten und damit die Kompensation verschiedener somatischer Schäden erfolgen (Sato *et al.*, 2006). Die mitochondriale Teilung wiederum ist insbesondere für die Vererbung von Mitochondrien wichtig. Da diese nicht *de novo*, sondern durch Wachstum bestehender Organellen entstehen, müssen sie während der Cytokinese geteilt und in die Tochterzellen transportiert werden (Warren & Wickner, 1996).

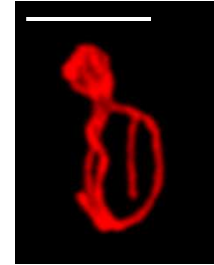


Abbildung 1-2: Mitochondriales Netzwerk einer Hefezelle auf fermentierbarer Kohlenstoffquelle. Die Visualisierung erfolgte mittels mtRFP. Der Größenbalken entspricht 5 μm .

In höheren Eukaryoten ist die Fusion zudem entscheidend für Entwicklungsprozesse wie Embryonalentwicklung (Chen *et al.*, 2003) und Spermatogenese (Hales & Fuller, 1997). Auch der antagonistische Prozess der Teilung ist in Entwicklungsprozesse involviert, indem er eine zelluläre Differenzierung während der Embryonalentwicklung in *C. elegans* (Labrousse *et al.*, 1999) und die Synapsenbildung (Li *et al.*, 2004) ermöglicht. Die mitochondriale Teilung ist außerdem maßgeblich an der Apoptose beteiligt. Sie bewirkt eine mitochondriale Fragmentierung, die der Cytochrom *c*-Freisetzung und Caspaseaktivierung vorangeht (Youle & Karbowski, 2005) (Zusammenfassung der physiologischen Bedeutung von Mitochondrien in Westermann, 2008).

1.6 Mitochondriale Fusion und Teilung in *S. cerevisiae*

Mitochondriale Fusion und Teilung sind antagonistische Prozesse, die in einem regulierten Zusammenspiel die mitochondriale Morphologie maßgeblich beeinflussen. Für die Aufrechterhaltung eines zusammenhängenden Retikulums herrscht ein Gleichgewicht zwischen Fusions- und Teilungsereignissen (in logarithmisch wachsenden Hefezellen auf glukosehaltigem Medium bis zu 2,5 Fusionen und Teilungen pro Zelle und pro Minute; Nunnari *et al.*, 1997; Jakobs *et al.*, 2003b). Kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts, z. B. durch Deletion von Teilungs- und Fusionskomponenten, so verändert sich die Struktur der Mitochondrien gravierend (Abb. 1-3). Ist die Teilung blockiert, schreitet die Fusion weiter voran und es entstehen stark verbundene, fischernetzartige Strukturen (z. B. in der $\Delta dnm1$ -Mutante; Otsuga *et al.*, 1998). Wird das Gleichgewicht, z. B. durch Inhibition der Fusionsmaschinerie, in Richtung Teilung verschoben, bilden sich getrennte Mitochondrienfragmente, die ihre mtDNA und damit ihre respiratorische Funktion verlieren. Interessanterweise bildet sich wieder ein wildtypähnliches Retikulum aus, wenn beide Prozesse gleichermaßen gestört werden (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki & Jensen, 1999). Die Grundmechanismen der mitochondrialen Dynamik und die beteiligten Proteine sind dabei evolutionär stark konserviert, sodass Erkenntnisse aus *S. cerevisiae* auch auf höhere Eukaryoten übertragen werden können (Merz *et al.*, 2007).

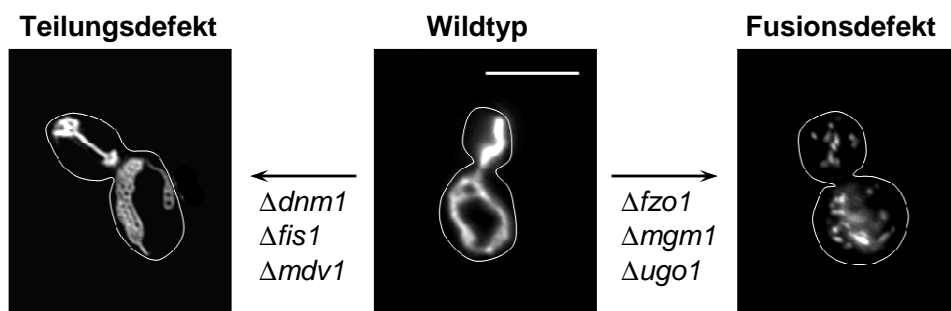


Abbildung 1-3: Mitochondrien bei Störung des Fusions- oder Teilungsgleichgewichts. Bei Beeinträchtigung der mitochondrialen Teilung, z. B. durch Deletion der Teilungskomponenten Dnm1, Fis1 und Mdv1 (Erklärungen sind Kapitel 1.6.2 zu entnehmen), bilden sich durch ein Voranschreiten der mitochondrialen Fusion hoch verzweigte fischernetzähnliche, mitochondriale Strukturen aus (links). Ist die mitochondriale Fusion gestört, z. B. durch Deletion der Fusionskomponenten Fzo1, Mgm1 und Ugo1 (Erklärungen sind Kapitel 1.6.1 zu entnehmen), kommt es zu verstärkter Teilungsaktivität, sodass mitochondriale Fragmente entstehen (rechts). Der Größenbalken entspricht 5 µm.

1.6.1 Die mitochondriale Fusionsmaschinerie

Die mitochondriale Doppelmembran erfordert den koordinierten Ablauf zweier Membranfusionsereignisse. Hierfür existieren individuelle Maschinerien in jeder Membran, deren Funktionen *in vivo* zeitlich gekoppelt sind. In Hefezellen wird die mitochondriale Fusion durch die evolutionär hoch konservierten GTPasen Fzo1 und Mgm1 und das hefespezifische Protein Ugo1 vermittelt. Fzo1 (*fuzzy onions*) wurde als erste mitochondriale Fusionskomponente entdeckt (Hales & Fuller, 1997; Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Das Protein besitzt eine GTPase-Domäne, zwei Transmembranregionen, die es in der mitochondrialen Außenmembran verankern, und mehrere Coiled-Coil-Domänen. Die Coiled-Coil-Strukturen und die GTPase-Domäne ragen in das Cytosol, wohingegen die kleine Loopregion zwischen den Transmembrandomänen im Intermembranraum lokalisiert ist (Abb. 1-4) (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998; Fritz *et al.*, 2001). Die dynamin-verwandte GTPase Mgm1 (*mitochondrial genome maintenance*; Homolog in Säugern: Opa1) besitzt einen hydrophoben Transmembrananker, eine GTPase-Domäne, eine mittlere Domäne unbekannter Funktion und eine GTPase-Effektordomäne (GED) (Wong *et al.*, 2003; Okamoto & Shaw, 2005). Mgm1 kommt in zwei Isoformen vor, einer langen Form (l-Mgm1), die integral in der Innenmembran sitzt, und einer kurzen Form (s-Mgm1), die durch proteolytische Prozessierung entsteht und im Intermembranraum peripher an der Innenmembran assoziiert ist (Herlan *et al.*, 2003; McQuibban *et al.*, 2003). Die dritte Fusionskomponente Ugo1 (*ugo*: japanisch für Fusion) liegt in der Außenmembran und besitzt drei Transmembrandomänen im Zentrum des Proteins sowie zwei Motive, die denen mitochondrialer Carrier-Proteine ähneln. Der N-Terminus befindet sich im Cytoplasma, wohingegen der C-terminale Teil des Proteins in den Intermembranraum ragt (Hoppins *et al.*, 2009).

Fzo1, Ugo1 und Mgm1 bilden einen dynamischen Komplex aus, der die Außen- und Innenmembran durchspannt (Sesaki *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2003) und dadurch möglicherweise die Fusionsereignisse der beiden Membranen koordiniert (Hoppins *et al.*, 2007). Das Vorliegen cytosolischer und intermembranraumständiger Domänen in Ugo1 legt nahe, dass dieses Protein als Adapter eine Interaktion zwischen Fzo1 und Mgm1 im Fusionskomplex vermittelt. Alternativ könnte Fzo1 direkt über seine Linkerregion im Intermembranraum mit Mgm1 wechselwirken (Merz *et al.*, 2007). Die mitochondriale Fusion verläuft in drei Schritten (Okamoto & Shaw, 2005). Zunächst bilden sich durch Oberflächenproteine der zu fusionierenden Mitochondrien *trans*-Komplexe aus, wobei Fzo1

maßgeblich beteiligt zu sein scheint (Westermann, 2008). Auch im zweiten Schritt der Fusion, der Vermischung der Lipiddoppelschicht, nimmt Fzo1 eine Schlüsselrolle ein. Aufgrund seiner Topologie könnte Fzo1 hierbei, analog zu viralen Fusionsproteinen oder SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*), durch Bildung α -helikaler Bündel entgegengesetzte Membranen in engen räumlichen Kontakt bringen und die Lipiddurchmischung initiieren (Griffin *et al.*, 2006; Westermann, 2008). Die durch die GTPase-Domäne bereitgestellte Energie wäre ausreichend, um die Energiebarriere zur Vermischung der Lipiddoppelschicht zu überwinden. Auch wenn bisher noch keine experimentellen Belege einer solchen Fusogenwirkung existieren, ist eine zentrale Rolle in diesem Prozess unumstritten (Okamoto & Shaw, 2005; Hoppins *et al.*, 2007; Westermann, 2008). Abschließend findet die Fusion der Innenmembranen statt. Analog zu Fzo1 könnte Mgm1 durch die Bildung von *trans*-Komplexen die räumliche Nähe der Membranen vermitteln und darüber hinaus auch eine Schlüsselrolle während der Lipiddurchmischung einnehmen (Meeusen *et al.*, 2006; Westermann, 2008). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch nicht bekannt.

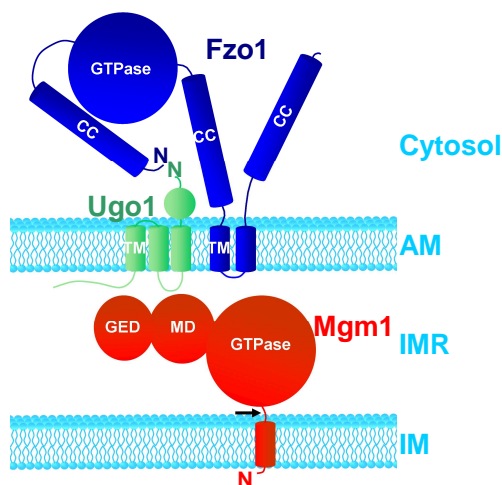


Abbildung 1-4: Die mitochondriale Fusionsmaschinerie in *S. cerevisiae*. Für die mitochondriale Fusion bilden die Proteine Fzo1 (blau), Ugo1 (grün) und Mgm1 (rot) einen dynamischen Komplex. Fzo1 bildet über seine C-terminale Coiled-coil-Domäne α -helikale Bündel, die die Membranen zu fusionierender Organellen in enge räumliche Nähe bringen. Durch proteolytische Spaltung (Spaltstelle durch Pfeil markiert) existiert Mgm1 in zwei Isoformen. Die N-Termini der Proteine sind jeweils gekennzeichnet (N). Details sind dem Text zu entnehmen. AM: mitochondriale Außenmembran; CC: Coiled-coil-Domäne; GED: GTPase-Effektordomäne; IMR: Intermembranraum; IM: mitochondriale Innenmembran (nach Westermann, 2008).

1.6.2 Die mitochondriale Teilungsmaschinerie

Nach heutigem Wissensstand besteht die mitochondriale Teilungsmaschinerie in *Saccharomyces cerevisiae* aus den vier Proteinen Dnm1, Fis1, Mdv1 und Caf4. Die Schlüsselkomponente der mitochondrialen Teilung ist dabei die dynaminverwandte GTPase Dnm1 (*dynamin-related*; Homolog in höheren Eukaryoten: Drp1). Dnm1 besteht aus einer N-terminalen GTPase-Domäne, einer mittleren Domäne gefolgt von einer hydrophilen Region unbekannter Funktion (Insert B) und einer C-terminalen GTPase-Effektordomäne (GED) (Hoppins *et al.*, 2007; Westermann, 2008; siehe auch Abb. 1-5). Die mittlere Domäne und die

GED vermitteln vermutlich homotypische Proteininteraktionen (Fukushima *et al.*, 2001). Dadurch ist Dnm1 in der Lage über Selbstassemblierung Multimere auszubilden (Hoppins *et al.*, 2007). *In vivo* assembliert Dnm1 in punktuellen Strukturen an Mitochondrien (Otsuga *et al.*, 1998), wobei die Entstehung und der Erhalt dieser mitochondrial lokalisierten Komplexe hochdynamisch sind und durch ständige Assoziation und Dissoziation bestimmt werden (Legesse-Miller *et al.*, 2003). Im nukleotidfreien oder GDP-gebundenen Zustand entstehen leicht gebogene Dnm1-Filamente und im GTP-gebundenem Zustand ausgedehnte Spiralstrukturen (Naylor *et al.*, 2006). So können sich GTP-abhängig mitochondrienumschließende Spiralen bilden, die vermutlich über mechanochemische Kraft die mitochondriale Teilung vermitteln. Dnm1 scheint also wie andere dynaminverwandte Proteine über Selbstassemblierung und die Bildung GTP-gebundener Spiralen zu funktionieren (Ingelman *et al.*, 2005).

Für eine stabile mitochondriale Bindung von Dnm1 werden die weiteren Teilungskomponenten Fis1 und Mdv1 (*mitochondrial division*) bzw. Caf4 (*CCR4 associated factor*) benötigt, wobei Fis1 die Funktion eines Membranankers übernimmt und Mdv1/Caf4 als Adapter dient. Fis1 (*fission*; Homolog in höheren Eukaryoten: Fis1 bzw. hFis1) ist als sogenanntes *tail-anchored* Protein über eine endständige, C-terminale Transmembrandomäne in der mitochondrialen Außenmembran verankert und dadurch gleichmäßig über die gesamte Mitochondrienoberfläche verteilt (Mozdy *et al.*, 2000). Der große N-terminale Teil des Proteins ragt in das Cytoplasma und beinhaltet sechs α -Helices (Abb. 1-5). Diese falten TPR-ähnlich (*tetratricopeptid repeat*) und bilden so eine hydrophobe konkave Oberfläche aus, die zwei Bindungsstellen enthält (Suzuki *et al.*, 2005). Das lösliche Protein Mdv1 besteht aus einer NTE-Domäne (*N-terminal extension*) mit zwei α -Helices, einer zentralen Coiled-coil-Region, über die homotypische Interaktionen stattfinden, und einem C-terminalen WD40-Motiv, das einen siebenblättrigen β -Propeller bildet. In seiner Adapterfunktion wechselwirken die beiden α -Helices der NTE mit der TPR-ähnlichen Domäne von Fis1 und das WD40-Motiv mit Dnm1. In Abhängigkeit von Dnm1 ist auch Mdv1 in punktuellen Strukturen an Mitochondrien assoziiert (Tieu & Nunnari, 2000; Cervený *et al.*, 2001; Tieu *et al.*, 2002). Caf4 ist ein Paralog von Mdv1, weist dementsprechend die gleiche Domänenstruktur auf (NTE, Coiled-coil-Region und WD40-Motiv) und kann die gleichen Interaktionen eingehen (Griffin *et al.*, 2005). Mdv1 und Caf4 rekrutieren so unabhängig voneinander Dnm1 an die Mitochondrien. Allerdings scheinen Caf4-enthaltende Komplexe nicht teilungsaktiv zu sein (Griffin *et al.*, 2005) und die $\Delta caf4$ -Deletionsmutante zeigt – anders als die der anderen drei Teilungskomponenten – keine engmaschigen mitochondrialen Netze, sondern ein wildtypisches Retikulum (Griffin *et al.*, 2005; Hoppins *et al.*, 2007). Das Protein ist also nicht

essentiell für die mitochondriale Teilung. Caf4 vermittelt zudem eine verstärkt polare Orientierung der Komplexe zum Zellkortex hin (Schauss *et al.*, 2006). Möglicherweise erfüllen die entsprechenden Mdv1 oder Caf4 enthaltenden, optisch unterscheidbaren Komplexe verschiedene Funktionen.

Für die koordinierte Funktion des Teilungsapparates schlagen Bhar *et al.* (2006) folgendes Modell vor: Im ersten Schritt wird Dnm1 über gleichmäßig an den Mitochondrien verteilte, prä-assemblierte Fis1-Mdv1-Komplexe an die Mitochondrien rekrutiert. Der kleinste Baustein der Dnm1-Assemblierung ist dabei ein Dimer (Ingerman *et al.*, 2005). Danach erfolgt eine GTP-abhängige Dnm1-Multimerisierung, die eine Reorganisation des mitochondrialen Mdv1 in fluoreszenzmikroskopisch sichtbare Multimere und damit die Ausbildung punktueller Teilungskomplexe nach sich zieht. Abschließend kommt es zu einer Aktivierung der Teilungskomplexe und der Teilung des Mitochondrientubulus. Zusätzlich zu seiner Adapterfunktion scheint Mdv1 *post-targeting* auch entscheidend für diese Aktivierung zu sein. Möglicherweise stabilisiert es die teilungsessentiellen Dnm1-Spiralen oder fördert deren Bildung, indem es die GTP-gebundene Form erhält oder als Polymerisationskeim wirkt (Naylor *et al.*, 2006).

Die Triebkraft der eigentlichen Teilung stellt die Bildung mitochondrienumschließender Dnm1-Spiralen und Ringe dar. Allerdings kommt es nur an einem Bruchteil der Dnm1-Assemblierungen tatsächlich zu einer Spiralisierung und zur Teilung. Zeitaufgelöste mikroskopische Analysen legen nahe, dass diese Ereignisse nur dann stattfinden können, wenn parallel zur Dnm1-Assemblierung eine Einschnürung des mitochondrialen Tubulus (*Constriction*) eintritt (Legesse-Miller *et al.*, 2003). *Constrictions* scheinen also eine Grundvoraussetzung für die mitochondriale Teilung zu sein (Jakobs *et al.*, 2003a; Legesse-Miller *et al.*, 2003). Ihre Bildung kann auch in $\Delta fis1$ - und $\Delta dnm1$ -Zellen beobachtet werden, erfolgt also als Fis1- und Dnm1-unabhängiges Ereignis (Jakobs *et al.*, 2003a), und reduziert den Durchmesser des Mitochondrientubulus von 300-400 nm auf ~100 nm. Interessanterweise entspricht dies etwa dem Durchmesser von Dnm1-Spiralen (Ingerman *et al.*, 2005). Möglicherweise wird erst durch die *Constrictions* die Ausbildung von mitochondrienumschließenden Spiralen möglich. Es ist unklar, wie die *Constrictions* entstehen und ob analog zur mitochondrialen Fusionsmaschinerie ein unabhängiger Innenmembranteilungsapparat existiert. Als mögliche Komponente, die diese Prozesse vermittelt, wird das mitochondriale Innenmembranprotein Mdm33 diskutiert (Messerschmitt *et al.*, 2003).

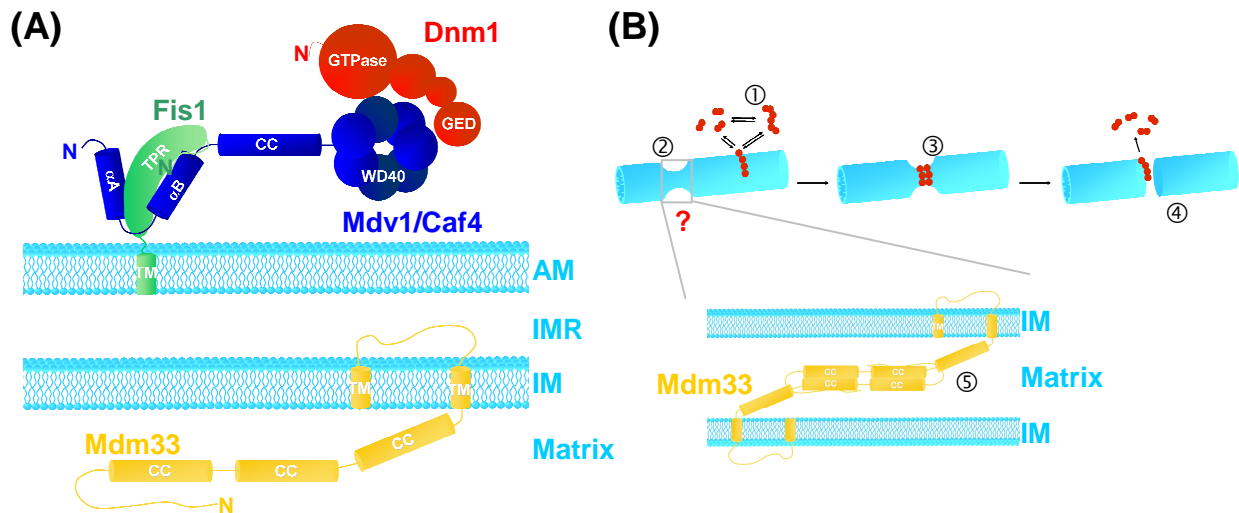


Abbildung 1-5: Die mitochondriale Teilungsmaschinerie in *S. cerevisiae*. (A) Für die mitochondriale Teilung bilden die Komponenten Dnm1, Fis1 und Mdv1/Caf4 einen Komplex aus. Dabei fungiert das integrale Außenmembranprotein Fis1 (grün) als mitochondrialer Anker für die paralogen Adapterproteine Mdv1/Caf4 (blau). Über deren WD40-Domäne erfolgt die Bindung des cytosolischen Proteins Dnm1 (rot). Die N-Termini der Proteine sind jeweils gekennzeichnet (N). αA und αB : α -Helices in der NTE-Domäne (*N-terminal extension*) von Mdv1 und Caf4; AM: mitochondriale Außenmembran; CC: Coiled-coil-Domäne; GED: GTPase-Effektordomäne; IMR: Intermembranraum; IM: mitochondriale Innenmembran (nach Westermann, 2008). (B) Die mitochondriale Assemblierung von Dnm1 (rot) ① und die Einschnürung des mitochondrialen Tubulus (*Constriction*; grauer Kasten) ② erfolgen als voneinander unabhängige Ereignisse. Nur wenn beide Prozesse aufeinandertreffen, können mitochondrienumschließende Dnm1-Spiralen gebildet werden ③, die die Teilung vermitteln ④. Mdm33 wird als Komponente diskutiert, die die Bildung von *Constrictions* und/oder die Innenmembranteilung über Bildung oligomerer Komplexe ⑤ vermitteln könnte. Die genaue Zusammensetzung dieser Komplexe, die Art der Wechselwirkungen und mögliche Wechselwirkungspartner sind nicht bekannt.

1.7 Die mitochondriale Morphologiekomponente Mdm33

Das Gen *MDM33* (*mitochondrial distribution and morphology*; systematischer Name: *YDR393W*) wurde in einem genomweiten Screen nach Hefedeletionsmutanten nicht-essentieller Gene mit veränderter mitochondrialer Morphologie identifiziert (Dimmer *et al.*, 2002). Seine Deletion bewirkt einen spezifisch mitochondrialen Morphologiedefekt. Es entstehen große ringähnliche oder hohlkugelförmige Organellen (Abb. 1-6), die noch Fusionskompetenz aufweisen (Messerschmitt *et al.*, 2003). Als Besonderheit auf ultrastruktureller Ebene bilden die Doppelmembranen von $\Delta m d m 3 3$ -Mitochondrien verlängerte Ausdehnungen, die einen engen Matrixraum umschließen. Möglicherweise entstehen durch Fusion dieser Ausdehnungen in der zweiten und dritten Dimension die fluoreszenzmikroskopisch sichtbaren ringähnlichen und hohlkugelförmigen Mitochondrien. Die Überexpression von *MDM33* bedingt einen starken Wachstumsdefekt, der bereits durch Espinet *et al.* (1995) gezeigt wurde (daraus ergibt sich der Alternative Name *SHE9*: *sensitivity to high expression*), und die Fragmentierung/Aggregation des mitochondrialen Netzwerks (Abb. 1-6). Gleichzeitig entstehen Septen oder vesikuläre Strukturen der mitochondrialen

Innenmembran und die Cristae gehen verloren (Messerschmitt *et al.*, 2003). Doppeldeletionsstudien zeigten, dass sich $\Delta mdm33$ epistatisch zu $\Delta fis1$ verhält, wohingegen $\Delta fzo1$ epistatisch zu $\Delta mdm33$ ist. Die Funktion von Mdm33 ist also notwendig für die Ausbildung der typischen netzartigen Mitochondrien in $\Delta fis1$ -Zellen und die Fusionsfähigkeit ist eine entscheidende Voraussetzung für die Bildung von ringähnlichen und hohlkugelförmigen Organellen im $\Delta mdm33$ -Hintergrund. Die Deletion von *MDM33* verhindert nicht die $\Delta fzo1$ -bedingte Fragmentierung von Mitochondrien (Messerschmitt *et al.*, 2003).

Mdm33 ist ein pilzspezifisches, 54 kDa großes Innenmembranprotein, das gemäß Sequenzanalyse zwei Transmembrandomänen besitzt (eine direkt am C-Terminus). Dadurch sind sowohl das C-terminale Ende als auch der große N-terminale Bereich, der mit hoher Wahrscheinlichkeit Coiled-coil-Strukturen ausbildet, in der mitochondrialen Matrix lokalisiert, und der Linkerbereich zwischen den Transmembrandomänen befindet sich im Intermembranraum (Abb. 1-5). Coimmunoprecipitations-Experimente identifizierten Mdm33 als Teil eines hochmolekularen Komplexes unbekannter Zusammensetzung, in dem es homotypische Wechselwirkungen eingeht (Messerschmitt *et al.*, 2003).

Ausgehend von diesen experimentellen Befunden schlägt das bestehende Wirkmodell vor, dass es sich bei Mdm33 um eine Teilungskomponente der Innenmembran handelt. Über *trans*-Wechselwirkungen seiner matrixständigen Coiled-coil-Strukturen könnte das Protein entgegengesetzte mitochondriale Innenmembranen in unmittelbare räumliche Nähe bringen und von der Matrixseite eine Membranfusion einleiten. Denkbar wäre, dass so auch die teilungsessentiellen *Constrictions* gebildet werden. Die mechanistischen Grundlagen und mögliche Wechselwirkungspartner von Mdm33 sind bisher unbekannt (Messerschmitt *et al.*, 2003).

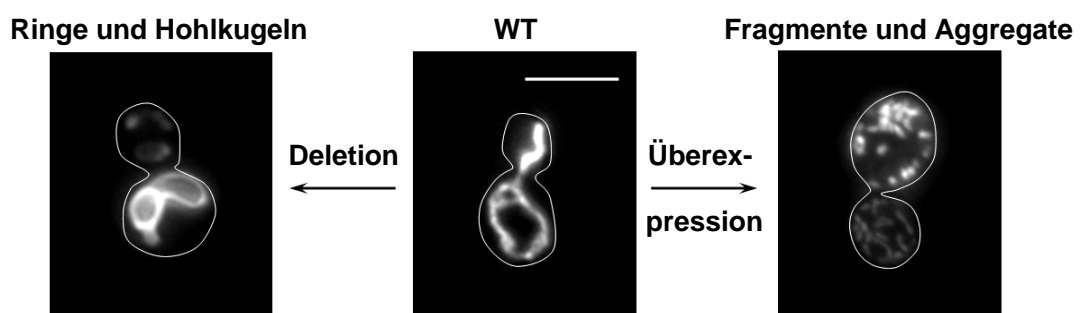


Abbildung 1-6: Die mitochondrialen Morphologie in Abhängigkeit von Mdm33. Das wildtypische mitochondriale Netzwerk geht bei Deletion von *MDM33* in ring- und hohlkugelähnliche Strukturen über (links). Bei Überexpression von *MDM33* entstehen fragmentierte und aggregierte Mitochondrien (rechts).

1.8 Zielsetzung

Aufgrund der großen physiologischen Bedeutung von Mitochondrien sind der Erhalt ihrer Funktion und ihre Morphogenese äußerst wichtig für die Zelle. Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten sind in diesen beiden Teilbereichen der mitochondrialen Biogenese noch viele Fragen offen. Beispielsweise konnten zwar durch klassische genetische Methoden und genomweite Durchmusterungen zahlreiche *pet*-Gene identifiziert werden, die genauen Zusammenhänge und molekularen Grundlagen, die für die Entstehung eines *pet*-Phänotyps entscheidend sind, sind aber auch heute noch nicht voll verstanden und systematisch erfasst. Im Bereich der mitochondrialen Morphogenese ist weitgehend unklar, wie die Teilung der mitochondrialen Innenmembran bewerkstelligt wird, und ob die bisher einzige identifizierte Komponente Mdm33 Wechselwirkungspartner besitzt. Bereits seit mehreren Jahren ist das Hefegenom komplett entschlüsselt und es stehen kommerziell erwerbliche Deletionsbibliotheken zur Verfügung, die Deletionsmutanten fast aller nicht-essentieller Hefegene enthalten. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, durch systematische, genomweite Analysen ein umfassendes Bild zellulärer Abläufe zu erhalten. Ausgehend von der ~4800 Hefestämme umfassenden *MAT α* -Deletionsbibliothek sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch geeignete Screeningverfahren weitere Einblicke in die zwei oben genannten Teilaspekte der mitochondrialen Biogenese gewonnen werden, (1) Erhalt der Atmungsfähigkeit und (2) Teilung als Bestandteil der Morphogenese.

Im ersten Teilabschnitt wurde ein genomweiter Screen nach respiratorisch inkompetenten Hefedeletionsmutanten durchgeführt, um die volle Anzahl der Gene zu erfassen, die eine Hefezelle für den Erhalt ihrer respiratorischen Aktivität benötigt. Vergleichende Gendeletionsanalysen sollten daraus den kompletten Satz an Genen liefern, die essentiell für die respiratorische Aktivität in Hefe sind. Weiterführend sollte durch systematische funktionelle Tests (Cytoduktions- und Komplementationsexperimente, sowie Studien der mitochondrialen Translation) aller identifizierten Kandidatenstämme ein umfassendes Bild der molekularen Prozesse erhalten werden, die für die respiratorische Kompetenz und den Erhalt sowie die Expression mitochondrialer DNA benötigt werden. Als besonders interessante Gruppe wurden dadurch Deletionsstämme erfasst, bei denen möglicherweise auch extragenomische Faktoren den Erhalt der respiratorischen Aktivität beeinflussen. Stellvertretend für die Vertreter dieser Gruppe sollte die Entstehung der respiratorischen Inkompetenz in den Cytochrom *c* Oxidase-Assemblierungs-Mutanten Δcox10 , Δcox16 , Δcox19 und Δmss2 detailliert erfasst werden, wobei speziell der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies untersucht wurde.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Studien zur mitochondrialen Formgebung durchgeführt, wodurch ein tieferes Verständnis von Mdm33 erhalten werden sollte. Bisher sind keine Wechselwirkungspartner dieses Proteins bekannt, obwohl seine vorgeschlagene, komplexe Wirkweise als mitochondriale Innenmembranteilungskomponente (Messerschmitt *et al.*, 2003) wahrscheinlich weitere Faktoren erfordert. Deshalb sollten in einer Durchmusterung von 164 Deletionsstämmen, in denen vor allem mitochondrial lokalisierte Proteine unbekannter Funktion fehlten, mögliche Interaktionspartner identifiziert werden. Dieses Verfahren beruhte auf der Überexpression von *MDM33*, die in Wildtypzellen zu einem Wachstumsarrest und einer Zerstörung des mitochondrialen Netzwerks führt (Messerschmitt *et al.*, 2003). Im Deletionshintergrund der Teststämmen sollten diese Defekte durch das Fehlen eines potentiellen Wechselwirkungspartners aufgehoben werden. Im Rahmen der Durchmusterung wurden deshalb die beiden Parameter Wachstumsverhalten und Mitochondrienmorphologie erfasst. Positive, d. h. Deletionsstämmen mit Überexpressions-toleranz, sollten weiterführend untersucht werden. Hierfür wurde eine funktionelle Charakterisierung durchgeführt (bestehend aus detaillierten Wachstumsanalysen, einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der mtDNA und einer Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie) sowie ultrastrukturelle Analysen mittels Transmissions-elektronenmikroskopie vorgenommen. Außerdem sollte der Einfluss von Mdm33 auf die Außenmembranteilungsmaschinerie erfasst werden, indem die mitochondriale Assemblierung von GFP-markiertem Dnm1 untersucht wurde. Eine Quantifizierung von Dnm1-Clustern sollte mögliche Unterschiede in Zahl, Form und Verteilung der Proteinassoziate zwischen Wildtyp- und $\Delta mdm33$ -Zellen aufdecken.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

Chemikalien und Biochemikalien wurden in der Regel von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Steinheim) im Reinheitsgrad p.a. oder „für Molekularbiologie“ bezogen. Die eingesetzten Enzyme stammten, wenn nicht anders angegeben, von Fermentas (St. Leon-Rot).

2.1 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

2.1.1 Präparation von DNA

2.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Mini-Präparation: Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse (Birnboim & Doly, 1979; Birnboim, 1983)

Die alkalische Lyse ist die am häufigsten genutzte Methode zur Präparation von *E. coli* Plasmid-DNA im Kleinmaßstab. Sie beruht darauf, dass der pH-Wert durch die Zugabe von NaOH weit ins Alkalische verschoben wird, was die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären DNA-Strängen destabilisiert. Ausschließlich die Plasmid-DNA ist aufgrund ihrer Konformation in der Lage, sich bei pH-Neutralisation vollständig zu renaturieren und kann somit selektiv wiedergewonnen werden (http://www.chemgapedia.de/vsengine/popup/vsc/de/glossar/a/al/alkalische_00032lyse.glos.html).

Transformierte *E. coli*-Zellen aus einer 1,5 ml LB-Amp^uN-Bakterienkultur (1% (w/v) Pepton (Carl Roth, Karlsruhe); 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt (Serva, Heidelberg); 1% (w/v) NaCl; 100 µg/ml Ampicillin) wurden mittels Zentrifugation (1 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124) geerntet und in 100 µl GTE-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 50 mM Glukose, 2 mg/ml RNaseA) resuspendiert. Für Zellaufschluss und alkalische Lyse wurde die Suspension zunächst mit 200 µl NaOH/SDS (0,2 M NaOH; 1% (w/v) SDS) durch Invertieren gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Neutralisation mit 150 µl KOAc (5 M; pH 4,8) wurden das Invertieren und die 5-minütige Inkubation auf Eis wiederholt. Die entstandenen Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10 min; 4°C; 13.000 rpm; Sigma 3K30, Rotor 12154-H) abgetrennt. Für die Fällung der Plasmid-DNA wurden 0,3 ml des erhaltenen Überstands abgenommen, mit dem zweifachen Volumen an 96%igem Ethanol (v/v) gemischt und zentrifugiert (15 min; 4°C; 13.000 rpm; Sigma 3K30, Rotor 12154-H). Das daraus

resultierende Nukleinsäurepellet wurde nach Waschen mit 70% (v/v) Ethanol für 1 h bei RT oder für 10 min bei 72°C getrocknet und in 30-50 µl EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) aufgenommen.

Midi-Präparation: Isolierung von Plasmid-DNA mit dem QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden)

Bei großem Bedarf an Plasmid-DNA wurde das QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Dafür wurden 50 ml LB-Amp-Flüssigmedium mit plasmidtragenden *E. coli*-Zellen beimpft und üN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min; 4°C; 4.000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44) vom Medium abgetrennt. Die weitere Durchführung ist der Anleitung des Herstellers zu entnehmen. Abweichend davon erfolgte die DNA-Fällung durch 60-minütige Zentrifugation bei 4°C und 5.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44). Die gereinigte Plasmid-DNA wurde in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) oder ddH₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.1.1.2 Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae*-Zellen

Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae* nach Burke *et al.* (2000)

Genomische DNA wurde zum Nachweis von Gendelektionen über PCR (2.1.2) nach dem Verfahren von Burke *et al.* (2000) gewonnen. Dafür wurden Hefezellen aus einer 10 ml YPD üN-Kultur (1% (w/v) Hefe Extrakt (Serva, Heidelberg); 2% (w/v) Pepton (USB, Cleveland, Ohio, USA), 2% (w/v) Glukose) durch Zentrifugation abgetrennt (2 min; 4°C; 5.000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44). Das erhaltene Pellet wurde mit 0,5 ml ddH₂O gewaschen, für den Zellaufschluss mit 0,2 ml Aufschlusspuffer (2% (v/v) Triton; 1% (w/v) SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM Na₂-EDTA), 0,2 ml Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol (25:24:1) sowie 0,3 g Glasperlen (Ø 0,2-0,25 mm) versetzt und 3-4 min gevortext. Nach Zugabe von 0,2 ml TE-Puffer und Zentrifugation (5 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124) wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem 1 ml 100% Ethanol p.a. vorgelegt worden war. Die beiden Fraktionen wurden durch Invertieren gemischt und 2 min bei RT und 13.000 rpm (Sigma 1-15, Rotor 12124) zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 0,4 ml TE-Puffer mit 3 µl RNaseA-Lösung (10 mg/ml) resuspendiert und 5 min bei 37°C inkubiert. Die reine DNA wurde daraus durch Fällung mit 10 µl 4 M Ammoniumacetat und 1 ml 100% Ethanol p.a. sowie Zentrifugation (5 min; RT;

13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124) als Pellet erhalten, 1 h bei RT getrocknet und in 50 µl TE-Puffer oder ddH₂O aufgenommen.

Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae* mit dem YeaStar™ Genomic DNA Kit (Zymo Research, Orange, USA)

Da das Verfahren nach Burke *et al.* (2000) in vielen Fällen DNA nicht in ausreichender Menge lieferte, wurde alternativ das YeaStar™ Genomic DNA Kit (Zymo Research, Orange, USA) verwendet. Die Präparation erfolgte gemäß Anleitung des Herstellers. Für die abschließende Elution der DNA wurden 50 µl TE-Puffer oder ddH₂O verwendet.

2.1.1.3 Isolierung von DNA aus zellfreien Systemen

Gelelution von DNA-Fragmenten

Waren in einem Ansatz – z. B. nach unvollständiger Restriktion – verschiedene DNA-Fragmente enthalten, so wurde das Fragment gewünschter Größe mittels Gelelution gereinigt. Nach Agarosegelelektrophorese (2.1.3) wurde die entsprechende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers weiter verarbeitet. Die DNA-Elution erfolgte in der Regel mit 30 µl EB-Puffer.

Reinigung von DNA mittels Qiagen PCR-Purification Kit

Die Gewinnung von DNA aus PCR-Ansätzen und nach den einzelnen Klonierungsschritten (2.1.4) erfolgte mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) gemäß der Anleitung des Herstellers. Für die abschließende Elution wurden 30-50 µl EB-Puffer oder ddH₂O verwendet.

Reinigung von DNA-Fragmenten durch Ethanol-Fällung

Die Präzipitation von DNA mit Ethanol ermöglicht die Konzentrierung der Nukleinsäuren und das Entfernen von unerwünschten Salzen. Dafür wurde die DNA-Lösung zunächst auf 0,3 M Natriumacetat eingestellt und mit dem 2,5-fachen Volumen an 100% Ethanol p.a. versetzt. Nach anschließender 15-minütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation (10 min; 4°C; 13.000 rpm; Sigma 3K30, Rotor 12154-H) wurde das erhaltene DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in dem entsprechenden Volumen ddH₂O resuspendiert.

2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion nach Mullis *et al.* (1986) können DNA-Fragmente in wiederkehrenden Zyklen aus Doppelstrangtrennung, Bindung zweier sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer) und DNA-Synthese mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase exponentiell amplifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Technik zur Herstellung von Klonierungsinseris und zum Nachweis von Deletions- und Wildtyp-Allelen verwendet. Dadurch wurden Hefestämme aus der *MAT α* -Deletionsbibliothek (BioCat, Heidelberg; *MAT α* , *his3*, *leu2*, *lys2*, *ura3*, *your favourite gene (yfg)::kanMX4*; Giaever *et al.*, 2002; Kastenmayer *et al.*, 2006) überprüft und hergestellte Doppelmutanten bestätigt. Standard 50 μ l-Reaktionsansätze setzten sich aus 200-500 ng Plasmid- oder genomischer DNA, 0,2 mM dNTPs (10 mM Stocklösung), 1x PCR-Puffer (polymerasespezifischer 10x Puffer des Herstellers; Promega, Mannheim), je 10 pmol *forward* und *reverse* Primer (100 pmol Stocklösung; Metabion, Martinsried), sowie 0,025 U/ μ l *GOTaq[®]*-DNA-Polymerase (5 U/ μ l; Promega, Mannheim) zusammen. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten zu Klonierungszwecken wurde die prozessivere *Pfu*-Polymerase (3 U/ μ l; Promega, Mannheim) verwendet, da diese eine *proofreading*-Aktivität besitzt. Reaktionen wurden im „PCR Sprint Thermal Cycler“ (Thermo Electric, Waltheim, USA) mit dem in Tab. 2-1 angegebenen Programm durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind Tab. 2-2 zu entnehmen.

Alternativ dazu wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Hefezellmaterial wurde von Medienplatten entnommen, in 200 μ l ddH₂O resuspendiert und für einen Zellaufschluss 10 min gekocht. Anstelle der Plasmid- oder der genomischen DNA wurden 5 μ l der Suspension als Matrize eingesetzt. Die weitere Zusammensetzung des Reaktionsansatzes, sowie PCR-Programm und Oligonukleotide entsprechen den beschriebenen Standardbedingungen.

Tabelle 2-1: PCR-Programm zum Nachweis von Deletions- bzw. Wildtyp-Allelen und zur Herstellung von Klonierungsinseris.

Reaktionsabschnitt	Temperatur und Dauer des Reaktionsabschnitts	
Anfangsdenaturierung	94°C / 5 min	1x
Denaturierung	94°C / 1 min	} 35x
Primer-Anlagerung	52-57°C / 1 min	
Kettenverlängerung	72°C / 1 min	
abschließende Kettenverlängerung	72°C / 10 min	1x

Tabelle 2-2: Verwendete Oligonukleotide. Angegeben sind Namen, Sequenzen und Schmelzpunkte in °C (T_m ; angegeben sind Basiswerte). Die Berechnung der Schmelzpunkte erfolgte mit Oligo Calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

Name	Sequenz (5' → 3')	T_m in °C
Forward Primer zum Nachweis von Allelen		
<i>Zum Nachweis der Kanamycin-Deletionskassette:</i>		
Kan-Kassette	CCG GAT TCA GTC ACT CAT GG	54
<i>Zum Nachweis der Wildtyp-Allele in fraglichen Stämmen:</i>		
WT-YAL012W	GGC CAC TAA TAA CAA GCC ATT GTA CGA G	60
WT-YAL047C	CAG TTA AAT ACT TTG GAC AAC CAA AAG TTA ATA CTA TC	59
WT-YBL038W	GTA GAG TGC CAG TTC GTA CA	58
WT-YBR163W	AGG CTC TAA TAC ATT TGA TAT GAC CGC GTT C	60
WT-YDL202W	GTC CAT TAC AAT AAT CTT TCC AAA A	58
WT-YDR268W	CAG CAT TTG GAA CTA ACA AGA CA	59
WT-YDR231C	GGG GTC AAA AGA TCC TCT TAG AAG ACA C	60
WT-YDR323C	CTT CCG CTG CAT ACA TAA ACG AAA AAA TCC TAC	61
WT-YDR332W	GTG GGG CCT CCC TTT AAA AGG TAA G	59
WT-YFL036W	TCG CAT CAG TTC ATG ATT CTT ACT GGA CG	60
WT-YIL036W	CAA TCC CTG GTA CTA CGG CAT GGA AG	61
WT-YJR090C	CGG GCA ACA TAG ATT ACC AAA AAG GGC	60
WT-YKL148C	CAG CCT GGG TTG CCA CAC AAA	56
WT-YML081C-A	GTT GAA AAG ATT CCC TAC CCC TAT CC	58
WT-YML129C	CCA AAT ACG CTT GGT ATA CCA GAG TTA CAG	60
WT-YMR066W	GTC GTC CAT TGT AAA GAA ATT AAT AAA AAG GCA G	58
WT-YOR205C	GGT ATT GAT GTA TTC AAC TCG TGC AAT TCA TC	59
WT-YPL029W	GCA GAC TAT TTC AGA TGA GCT A	58
WT-YPR047W	CTC GAA CTC TGC GGA TGC	58
WT-YPR124W	CTC TTT CAT GAC ATT ATA AGG GCG TTC TTA G	59
<i>Zum Nachweis der Wildtyp-Allele in COX-Stämmen:</i>		
WT-COX10	GAC GTG ATT CGG GCG TGA TTA ATA TTC C	60
WT-COX16	CGG GTT ATG GCC GTA CAC AAG TTA TTA G	60
WT-COX19	GGA GTT GAG AAA CGA GAA AAT CCA AAT AAA GC	59
WT-MSS2	GGA ATT CGT TTT TAG ATT TTA ACA ACA ACA ATA TGA GGG	60
Reverse Primer zum Nachweis von Allelen		
<i>Zur Überprüfung der hergestellten Doppelmutante:</i>		
Mdm33_R	GAC TGT ACC ATT GAG TTG AGC C	55
<i>Zum Nachweis der Deletions-Allele in fraglichen Stämmen:</i>		
YAL012W	GAT TGC GGA TGA GTA AGC GAA GAG TTA TAG	60
YAL047C	GGA TCT GAA ATG AGG CAA CCA AAA GAG AG	60
YBL038W	GTT TTT TCT TTG CAG CAT CGA AAT	58
YBR163W	CCA AAG AAC TGA ATC TTG TAG AAT TGA AGG AC	59
YDL202W	TGA CGA TAA TAT CTC TTC TTT GG	58
YDR268W	CTC AAC TCC TTG GCC GCA A	59
YDR231C	GAG AGA CTG CTG GAG AAG CA	60
YDR323C	GAA GCT TCT ATT TAT GTT GAA GCT TCC TTC AG	59
YDR332W	GCA ATC ACC TTT CTT TAT TGC GGG AAT CC	60
YFL036W	CTG GAC GCA AAC AAT AGA CAG GTT TCA C	60
YIL036W	GGC ATA GAT TCA TCA ATG ATG GTA ATA AAC ATT TAA GC	60
YJR090C	CTA GCT AAT GAC AAA GAC GGT GAT CTG G	60
YKL148C	AAA ATC CTG ACC ATC ACG AAT AC	59
YML081C-A	CAA GAA AAT CTA CTA CCC TAA TCT	58
YML129C	ATA AAT AAT GTA CAA TTT TAC GGG TG	58
YMR066W	CCC GAT AGA AGC CAT ATT CAA ATA GCA TTC	59
YOR205C	GCA ATT AAG ATT TTC ATC TTT TAG TGA AAA GAT GAA GG	59
YPL029W	TTT CGT CAA AAT CCT TGG ATG C	58

Name	Sequenz (5' → 3')	T _m in °C
YPR047W	TGG TTG AGC AAA TTC GAC GG	58
YPR124W	GAT TTC TTT ATG AAA TTT TCT TTA CTC GAA CCT AAA TAT CAC	60
<i>Zum Nachweis der Deletions-Allele in COX-Mutanten:</i>		
cox10	GAAAGATATA GCTAAGCTAG TAGCACCTG	59
cox16	GTTGAATTAT CGGTATTTCT TCCGGAAGGG	60
cox19	CC GGTAGATCTG GGAAGTAAAT ACTAAAC	59
mss2	CAAGGATGAT ACGCTCAATT TACTGGATAC	59
<i>Zum Nachweis der Deletions-Allele in pet-Stämmen der MATα-Bibliothek:</i>		
YAL013W	GAA CCA GAG GAG AAA GCC AAC CC	59
YBR128C	CAC TTG CAC AAT GGC TCT ATC TCC TC	60
YBR146W	GAT ATG GAT CCA GCC ATC CCA CTG	59
YDL077C	CCC AGC AAT TCT TCC TTT TTC CCT TAG TC	60
YDL157C	CCA AGA TTA CCC AAA GAC CGT ATC TAT TCC	60
YDR448W	CGT AAG GAT CTA CCA GAA TTG TAT TTG AAA ACA G	60
YGL017W	CTT GAC ATT CGC AGA GTA CTT GTC ATC AG	60
YGR243W	CTTATCCAATAAGAACGTAGATGC	60
YMR015C	CAT CCT TCT TGG ATT GCA AAA AGA TTA GCT G	59
YPL188W	GCT GCA CCA TTT ATC TCA TAA TTA TTG CCT AC	59
<i>Zum Nachweis der Deletions-Allele in den neu identifizierten pet-Stämmen:</i>		
YDR065W	GGT ACC CGC TAT GCT ATA AGA GTG CG	61
YGR150C	GGG CAG TTA AAT TAA GGT CAC CTT GGC	60
YJL046W	GGT CCA AAT GGC GAC ATT GAA GAC AC	60
YLL033W	CTA GGG TCT GCC TCC AGC AAG AG	61
YLR091W	CGC CCT TTG AGC TGT TCA CTG CG	61
YMR098C	TTG CCG GGC ATA AGA TCC TTT CTA GTG	60
YMR293C	GGT GTG GCC TTC ACT TTC GGC G	60
YOR305W	CGA TAA GTT CGG TAG GTT TAA CGT CGC	60
YPR116W	GAG ACC ACG GTA ACA TAG ACA TTG TAG AT	59
<i>Zum Nachweis der Deletions-Allele in den neu identifizierten Translationskomponenten:</i>		
YAL039C	GGT TGC GAC ACT TCC CCA GAA GG	61
YDR529C	CTA CGA GGA GAA CCC CTC CAC G	60
YEL051W	AAT TTT AGT AGA AAA GAA GCA ACA TAG GGA CC	58
YJL062W-A	CCA TTG GTG CAC GTT GTT GAA GTG GG	61
YOL096C	GAT GTG GTT CAC GAC CCG TCA CTT G	61
Primer zur Klonierung von pRS416-MSS2 und -COX16		
Cox16fw-BamHI	GGA TCC AAT ATT ACC GTG AAT ATC GCG AGC TAC	63
Cox16rev-XhoI	CTC GAG AGG TAT TTA CAA TCA TTT CCT AGA CAT TCT	61
Mss2fw-BamHI	GGA TCC GAT TTT ATG TGT GGA ATG CTA ACG ATG AAC	63
Mss2rev-XhoI	CTC GAG CTCTAA CAG TAT TTC CTA ATT ATT TCA TAG GTA AC	63

2.1.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse oder Reinigung wurden DNA-Fragmente elektrophoretisch mit 0,8%igen (w/v) Agarosegelen getrennt. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer (90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA; pH 8,35). Für die Separation wurde eine Spannung von 8-10 V/cm angelegt. Die Nukleinsäuren wurden durch Interkalation von Ethidiumbromid und Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm sichtbar gemacht.

2.1.4 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.1.4.1 Präparativer Restriktionsverdau

In einem 50 µl Gesamtansatz wurden 3-4 µg DNA mit 20-40 U Restriktionsenzym (10 U/µl; Fermentas, St. Leon-Rot) und 5 µl des dazugehörigen 10x Puffers versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung der Enzyme gemäß der Anleitung des Herstellers sowie die DNA-Isolierung mittels PCR-Purification Kit (2.1.1.3). Bei zwei verschiedenen Schnittstellen wurden, wenn möglich, Doppelverdaus mit 20-40 U pro Restriktionsenzym im passenden 10x Puffer durchgeführt (vgl. <http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html>).

2.1.4.2 Dephosphorylierung

Um eine Religation des linearisierten Vektors zu verhindern, wurden die dafür von Ligasen benötigten 5'-Phosphate enzymatisch entfernt. Hierfür wurden 2-4 µg verdauter Vektor, 10 U Antarctic Phosphatase (5 U/µl; NEB, Frankfurt a. M.) und 5 µl 10x Puffer in einem 50 µl Reaktionsansatz zusammen gegeben. Nach einstündiger Inkubation erfolgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C und/oder die Reinigung der DNA mittels PCR-Purification Kit (2.1.1.3).

2.1.4.3 Ligation

Der linearisierte, dephosphorylierte Vektor (0,1-0,5 µg) und das verdaute Insert wurden in einem 20 µl Gesamtansatz im Verhältnis 1:3 bis 1:5 mit 2 µl Ligase-Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase (1 U/µl; Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Die Reaktion war nach 5 h bei RT oder üN bei 4°C abgeschlossen. 10 µl des Ligationsansatzes wurden nach Hitzeinaktivierung (10 min, 65°C) in *E. coli*-Transformationen analog 2.1.5.2 eingesetzt.

2.1.4.4 Klonierung von *MSS2* und *COX16*

Für die Konstruktion der Plasmide pRS416-*MSS2* und pRS416-*COX16* wurden die entsprechenden Gene *MSS2* und *COX16* mit den Primern Cox16fw-*Bam*HI und Cox16rev-*Xho*I bzw. Mss2fw-*Bam*HI und Mss2rev-*Xho*I (Tab. 2-2) von genomischer DNA amplifiziert (2.1.2) und über die *Bam*HI und *Xho*I-Schnittstelle in die *Multiple Cloning Site* des Vektors pRS416 (Sikorski & Hieter, 1989) eingebracht.

2.1.5 Übertragung von genetischem Material in *E. coli*-Zellen

2.1.5.1 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen

Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-blue (Stratagene, La Jolla, USA) wurden üN auf LB-Platten (1% (w/v) *Pepton* (Carl Roth, Karlsruhe); 0,5% (w/v) *Hefe-Extrakt* (Serva, Heidelberg); 1% (w/v) *NaCl*; 2% (w/v) *Agar-Agar*) angezogen und zur Herstellung einer 5 ml üN-Kultur in LB-Flüssigmedium (*analog LB-Platten; ohne 2% (w/v) Agar-Agar*) verwendet. Je 100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml dieser üN-Kultur beimpft. Nach 1 h wurde die OD₆₀₀ in 30 min Schritten verfolgt, bis ein Wert von 0,2-0,4 erreicht war. Die Kulturen wurden anschließend 2 min auf Eis gekühlt und durch 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 7.000 rpm (*Beckmann-Zentrifuge J2-21, Rotor JA-10*) geerntet. Das Pellet wurde in 30 ml eiskaltem, sterilfiltriertem Tfb I-Puffer (100 mM *RbCl*; 50 mM *MnCl*₂; 10 mM *CaCl*₂ Dihydrat; 30 mM *Kaliumacetat*; 15% (v/v) *Glyzerin*; pH 5,8 mit *Essigsäure* eingestellt) resuspendiert und 30-60 min auf Eis inkubiert. Durch erneute Zentrifugation (10 min; 4°C; 7.000 rpm; *Beckmann-Zentrifuge J2-21, Rotor JA-10*) wurden die Zellen pelletiert. Das gesamte Zellmaterial wurde in 3 ml sterilem Tfb II-Puffer (10 mM *MOPS*; 10 mM *RbCl*; 75 mM *CaCl*₂; 15% (v/v) *Glyzerin*; pH 7,0 mit *NaOH* eingestellt) aufgenommen. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte das Aufteilen in je 100 µl-Aliquots, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurden.

2.1.5.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

100 µl chemischkompetente *E. coli*-Zellen des Stammes XL1-blue wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 µg gereinigter Plasmid-DNA (in 5 µl ddH₂O) oder 10 µl Ligationsansatz versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min auf Eis erfolgte ein 90-sekündiger Hitzeschock bei 42°C. Der Transformationsansatz wurde danach kurz auf Eis gekühlt und mit 500 µl LB-Flüssigmedium gemischt. Die Zellen wurden anschließend für 30-45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 100 µl von jedem Ansatz wurden auf LB-Amp-Selektionsplatten (*analog LB-Platten; zusätzlich 100 µg/ml Ampicillin*) ausgebracht und 12-14 h bei 37°C kultiviert.

2.1.6 Analytischer Restriktionsverdau

Der analytische Restriktionsverdau diente zur Überprüfung von Plasmid-DNA nach Mini- oder Midi-Präparation (2.1.1.1). Ein Reaktionsansatz bestand aus 1 µg gereinigter Plasmid-DNA, 5-10 U je Enzym (10 U/µl; Fermentas, St. Leon-Rot), 1 µl enzymespezifischem 10x Reaktionspuffer, sowie ddH₂O ad 10 µl und wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Die Restriktions-

produkte wurden anschließend mit 5 µl Gel-Ladepuffer (4 M Harnstoff, 10 mM EDTA, 50% (v/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und mittels Agarosegelelektrophorese (2.1.3) analysiert.

2.2 Methoden der Hefegenetik

Gängige Methoden der Hefegenetik sind in Burke *et al.* (2000) zusammengefasst.

2.2.1 Verwendete Hefestämme

Ein Großteil der eingesetzten Stämme wurde aus der *MATα*-Deletionsbibliothek mit Zusatzplatten kleiner ORFs entnommen (BioCat, Heidelberg; *MATα*, *his3*, *leu2*, *lys2*, *ura3*, *yfg::kanMX4*; Giaever *et al.*, 2002; Kastenmayer *et al.*, 2006). Im Zuge des *pet*-Screens wurden alle enthaltenen Stämme und für den *MDM33*-Überexpressionsscreen eine Auswahl daraus verwendet (Tab. A7). Ausschließlich die im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisierten sowie alle nicht aus der Bibliothek stammenden Hefestämme sind in Tab. 2-3 zusammengefasst. Varianten, die lediglich mit Plasmiden transformiert worden waren, die für mtGFP- oder mtRFP kodieren, sind nicht aufgeführt. Alle verwendeten Plasmide sind Tab. 2-4 zu entnehmen.

Tabelle 2-3: Verwendete Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
Isogener Wildtyp BY4742	<i>MATα</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i>	Brachmann <i>et al.</i> (1998)
$\Delta\text{cox10}/\text{COX10}$	<i>MATα</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , <i>cox10::kanMX4</i> , [<i>LEU2</i> , <i>COX10</i>]	diese Arbeit
$\Delta\text{cox16}/\text{COX16}$	<i>MATα</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , <i>cox16::kanMX4</i> , [<i>URA3</i> , <i>COX16</i>]	diese Arbeit
$\Delta\text{cox19}/\text{COX19}$	<i>MATα</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , <i>cox19::kanMX4</i> , [<i>URA3</i> , <i>COX19</i>]	diese Arbeit
$\Delta\text{mss2}/\text{MSS2}$	<i>MATα</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , <i>mss2::kanMX4</i> , [<i>URA3</i> , <i>MSS2</i>]	diese Arbeit
Δmip1	<i>MATα</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>met15</i> , <i>ura3</i> , <i>mip1::kanMX4</i>	Euroscarf (Frankfurt)
Δcox10	<i>MATα</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>met15</i> , <i>ura3</i> , <i>cox10::kanMX4</i>	Euroscarf (Frankfurt)
Δcox16	<i>MATα</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>met15</i> , <i>ura3</i> , <i>cox16::kanMX4</i>	Euroscarf (Frankfurt)
Cytoduktionsdonor J1361	<i>MATα</i> , <i>CEN1-16:pGal-K.lactis-URA3</i> , <i>his3</i> , <i>lys2</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>kar1Δ15</i>	Lettier <i>et al.</i> (2006)
$\Delta\text{atp3}/[\text{pYX223}][\text{pVT100U-mtGFP}]$	<i>MATα</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , <i>atp3::kanMX4</i> , [<i>HIS3</i> , <i>URA3</i>]	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
$\Delta ybr163w$ /[pYX223] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, ybr163w::kanMX4, [HIS3, URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta ydr061w$ /[pYX223] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, ydr061w::kanMX4, [HIS3, URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta yer004w$ /[pYX223] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, yer004w::kanMX4, [HIS3, URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta ygl080w$ /[pYX223] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, ygl080w::kanMX4, [HIS3, URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta mdv1$ /[pYX223] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, mdv1::kanMX4, [HIS3, URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta dnm1$ /[pYX223] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα/α, his3, leu2, ura3, dnm1::kanMX4, [HIS3, URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta ylr091w$ /[pYX223] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, ylr091w::kanMX4, [HIS3, URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta ylr356w$ /[pYX223] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, ylr356w::kanMX4, [HIS3, URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta yml030w$ /[pYX223] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, yml030w::kanMX4, [HIS3, URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta atp3$ /[pYX223-GAL-MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, atp3::kanMX4, [HIS3, URA3, GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
$\Delta ybr163w$ /[pYX223-GAL-MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, ybr163w::kanMX4, [HIS3, URA3, GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
$\Delta ydr061w$ /[pYX223-GAL-MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, ydr061w::kanMX4, [HIS3, URA3, GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
$\Delta yer004w$ /[pYX223-GAL-MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, yer004w::kanMX4, [HIS3, URA3, GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
$\Delta ygl080w$ /[pYX223-GAL-MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, ygl080w::kanMX4, [HIS3, URA3, GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
$\Delta mdv1$ /[pYX223-GAL-MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, mdv1::kanMX4, [HIS3, URA3, GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
$\Delta dnm1$ /[pYX223-GAL-MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα/α, his3, leu2, ura3, dnm1::kanMX4, [HIS3, URA3, GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
$\Delta ylr091w$ /[pYX223-GAL-MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, ylr091w::kanMX4, [HIS3, URA3, GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
$\Delta ylr356w$ /[pYX223-GAL-MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, ylr356w::kanMX4, [HIS3, URA3, GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
$\Delta yml030w$ /[pYX223-GAL-MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, yml030w::kanMX4, [HIS3, URA3, GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
<i>DNM1-GFP</i>	<i>MATα, his3, leu2, met15, ura3, DNM1-GFP, kanMX6</i>	Schauss et al. (2006)
$\Delta mdm33$ -DNM1-GFP	n.d., <i>DNM1-GFP, kanMX6, mdm33::kanMX4</i>	diese Arbeit

2.2.2 Anzucht von Hefezellen

Als Standardmedium für die Anzucht von Hefezellen wurde YPD (1% (w/v) *Hefe Extrakt* (Serva, Heidelberg); 2% (w/v) *Pepton* (USB, Cleveland, Ohio, USA); 2% *Glukose*) verwendet. Für obligat respiratorischen Metabolismus wurde YPG-Medium (1% (w/v) *Hefe Extrakt* (Difco, Lawrence, USA); 2% (w/v) *Pepton* (USB, Cleveland, Ohio, USA); 3% *Glyzerin*) eingesetzt. Die Selektion auf Zellen mit spezifischen Auxotrophiemarkern, z. B. nach Transformation mit Plasmiden oder in Paarungsexperimenten, erfolgte auf Selektivmedium mit 2% *Glukose* (SD: 0,69% (w/v) *Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren* (Formedium, Norwich, UK) *supplementiert mit Stammlösungen an 10 mg/l Amino- und 2 g/l Nukleinbasen entsprechend der gewünschten Selektionswirkung* (je 2 ml *Histidin, Methionin und Tryptophan*, sowie 3 ml *Lysin oder Leucin* und jeweils 10 ml *Uracil und Adenin-Sulfat*); 2% (w/v) *Glukose*) und Gal-induzierte Genexpression wurde unter Selektionsdruck auf entsprechendem Selektivmedium mit 2% *Galaktose* (SGal) vorgenommen. Das Kanamycin-Derivat Genitacin G418 (250 µg/ml) fand Verwendung für die Selektion von deletionsalleltragenden, kanamycinresistenten Hefezellen. Für die Herstellung von Medienplatten wurde den oben angegebenen Medien 2% (w/v) *Agar-Agar* zugesetzt. Die Standard-Kultivierungstemperatur betrug 30°C. Kolben und Reagenzgläser wurden unter Schütteln (150 rpm) inkubiert.

2.2.3 Wachstumsanalysen

2.2.3.1 Semiquantitative Wachstumstests zur Erfassung des *MDM33*-Überexpressionseffekts

Um für eine große Anzahl an Hefestämmen einen Überblick über das Wachstumsverhalten bei Überexpression von *MDM33* zu ermöglichen, wurden semiquantitative Wachstumstests durchgeführt. Dazu wurde jeweils die gleiche Menge an Zellmaterial strichförmig auf SGal-Platten ausgebracht. Für jeden zu untersuchenden Deletionsstamm wurden Kontroll- (pYX223) und Überexpressionsplasmid (pYX223-*GAL-MDM33*) enthaltende Transformanten zum Vergleich nebeneinander aufgetragen. Nach 2tägiger Inkubation bei 30°C wurde das Wachstum aller Stämme mit und ohne Überexpression von *MDM33* in die vier Stufen +++, ++, + und – eingeteilt, wobei +++ das stärkste und – kein Wachstum kennzeichnete. Als Referenz wurde jeweils parallel der transformierte Wildtypstamm BY4742 bewertet.

2.2.3.2 Erfassung des Wachstumsverhaltens mittels Tüpfel-Test

Tüpfel-Tests (=drop dilution test) dienten zur Erfassung des Wachstumsverhaltens bei Überexpression von *MDM33* oder möglicher respiratorischer Defekte. Im ersten Fall wurden SD- und zur Induktion der Überexpression SGal-Platten benötigt. Die zweite Fragestellung konnte mit Hilfe von YPD- und YPG-Platten untersucht werden. In beiden Fällen stellten die glukosehaltigen Medien eine stammspezifische Referenz dar.

Die zu untersuchenden Stämme wurden in 1,5 ml SD- oder YPD-Flüssigmedium üN bei 30°C angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1 wurden die Zellen durch Zentrifugation (1 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124) abgetrennt, zur Beseitigung von Medienresten in 1 ml ddH₂O gewaschen und schließlich in 1 ml ddH₂O resuspendiert. Von der erhaltenen Zellsuspension wurde eine Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzschritten bis 10⁻⁴ hergestellt. 5 µl jeder Verdünnungsstufe wurden auf SD- und SGal-, bzw. YPD- und YPG-Platten getropft. Pro Platte wurden 4 bis 5 Stämme aufgetragen, wobei stets eine Wildtypkontrolle mit inbegriffen war. Die Platten wurden zwei (YPD und SD) bis vier Tage (YPG und SGal) bei 30°C inkubiert.

2.2.3.3 Erfassung des Wachstumsverhaltens mit Wachstumskurven

Für das Erstellen von Wachstumskurven wurden 10 bis 15 ml Medium (YPD, YPG, SD, SGal) mit einer entsprechenden 1,5 ml üN-Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1-0,2 inokuliert. Die Kulturen wurden unter Schütteln bei 30°C inkubiert. In 60-Minuten-Schritten wurde die OD₆₀₀ bis zur stationären Phase gemessen. Durch halblogarithmische Auftragung der logOD gegen die Zeit t in min ergab sich die Wachstumskurve. Aus dem linearen Bereich der Kurve ließ sich mit Gleichung 1 die Generationszeit g berechnen.

Gleichung 1:

$$g = \frac{\log 2 \times t}{\Delta \log OD_{600}}$$

2.2.4 Übertragung von genetischem Material in *S. cerevisiae*-Zellen

2.2.4.1 Standard Hefetransformation und verwendete Plasmide

Um Plasmid-DNA in Hefezellen einzubringen wurde das „Quick and Easy TRAF0 Protocol“ (<http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/Quick.html>) verwendet. Die zu transformierenden Hefestämme wurden jeweils auf einem etwa 1 cm² umfassenden Areal auf

YPD- oder Selektivmediumplatten ausgestrichen und üN bei 30°C inkubiert. Das dadurch erhaltene, frische Zellmaterial wurde in 1 ml ddH₂O gewaschen (1 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124). Parallel dazu wurde die als Carrier eingesetzte Heringsspermien-DNA (2 mg/ml in ddH₂O; Sigma, Taufkirchen) durch 10-minütiges Kochen denaturiert. Zur Durchführung der Transformation wurden die gereinigten Zellen mit folgenden Komponenten in der angegebenen Menge und Reihenfolge durch Auf- und Abpipettieren gemischt: 240 µl 50% (w/v) PEG 4000, 36 µl 1,0 M LiAc, 50 µl gekochte ss-Carrier-DNA (2 µg/ml) und 1 µg Plasmid-DNA enthalten in 34 µl ddH₂O. Der Gesamtansatz wurde durch Vortexen gemischt und 60-90 min bei 42°C inkubiert. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 180 min erhöhte bei einigen Stämmen die Transformationseffizienz um eine Zehnerpotenz. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (1 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124) vom Transformationsmix abgetrennt und in 1 ml ddH₂O resuspendiert. 300 µl der Lösung wurden auf geeigneten SD-Selektivmediumplatten verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 2-4 Tagen bei 30°C wurden transformante Kolonien sichtbar, die zur weiteren Reinigung im Dreistrichverfahren auf frische Selektivmediumplatten überführt wurden. Alle verwendeten Plasmide sind Tab. 2-4 zu entnehmen.

Tabelle 2-4: Verwendete Plasmide

Name	Selektions- marker	Verwendung	Referenz
pVT100U-mtGFP	<i>URA3</i>	Markierung von Mitochondrien	Westermann & Neupert (2000)
pVT100U-mtRFP	<i>URA3</i>	Markierung von Mitochondrien	Mark Dürr (Institut für Zellbiologie, Uni Bayreuth)
pYX113-mtGFP	<i>URA3</i>	Markierung von Mitochondrien	Westermann & Neupert (2000)
pYX142-mtGFP	<i>URA3</i>	Markierung von Mitochondrien	Westermann & Neupert (2000)
pRS416-mtRFP	<i>URA3</i>	Markierung von Mitochondrien	Mozdy <i>et al.</i> (2000)
pYX223	<i>HIS3</i>	Negativkontrolle bei Überexpression von <i>MDM33</i>	Novagen (Darmstadt)
pYX223-GAL- <i>MDM33</i>	<i>HIS3</i>	Überexpression von <i>MDM33</i>	Messerschmitt <i>et al.</i> (2003)
pRS416	<i>URA3</i>	Klonierungszwecke	Sikorski & Hieter (1989)
pRS416- <i>MSS2</i>	<i>URA3</i>	plasmidale Expression von <i>MSS2</i>	diese Arbeit
pRS416- <i>COX16</i>	<i>URA3</i>	plasmidale Expression von <i>COX16</i>	diese Arbeit
pG19/T4	<i>LEU2</i>	plasmidale Expression von <i>COX10</i>	Nobrega <i>et al.</i> (1990)
pG188/T1	<i>URA3</i>	plasmidale Expression von <i>COX19</i>	Nobrega <i>et al.</i> (2002)

2.2.4.2 Übertragung mitochondrialer DNA durch Cytoduktion

Die Cytoduktion stellt eine Methode zum Transfer von Biomolekülen von einer Donor- auf eine Akzeptorzelle dar. Grundlage für diese Technik ist die unvollständige Paarung zweier Hefezellen. Dabei lässt der Kernfusionsdefekt (*kar1Δ15* Mutation) eines Paarungspartners lediglich die Vermischung des Cytoplasmas einschließlich aller darin enthaltenen Moleküle sowie Organellen, nicht aber die Verschmelzung der Zellkerne zu. Infolgedessen bilden sich keine diploiden, sondern dikaryote Zellen. Dieser Status ist instabil, sodass im Verlauf der weiteren Vermehrung einer der Kerne verloren geht. Die dadurch entstandenen Zellen weisen nun ein gemischtes Cytoplasma (Heteroplasmon) auf. Gezielte Selektion gegen die verbliebenen Donorkerne und möglicherweise sporadisch entstandene diploide Zellen wurde durch die Auswahl der verwendeten Stämme möglich. Die Akzeptorzellen waren Uracil-auxotroph (*ura3*), wohingegen der verwendete Donorstamm so konstruiert war, dass auf jedem Chromosom eine Kopie des Gal-überexprimierbaren *URA3*-Gens vorlag. Durch das kodierte Genprodukt wird 5-FOA in ein toxisches Produkt umgewandelt, sodass alle Zellen mit wildtypischem *URA3*-Gen getötet werden (vgl. Abbildung 2-1).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Cytoduktion zur Übertragung von intakten Mitochondrien und damit mtDNA verwendet. Das zugrunde liegende Protokoll und der Donorstamm J1361 (Lettier *et al.*, 2006) wurden von Robert Reid (Dept. of Genetics & Development, Columbia Univ. College of Physicians and Surgeons, USA) zur Verfügung gestellt.

Der Donorstamm wurde in Form eines Rasens und die Akzeptorstämme punktförmig auf getrennten Medienplatten angezogen. Für die Paarung wurden der Donorrasen mit Hilfe eines Samtstempels und die Rezipienten mittels Stempelwerkzeug auf eine gemeinsame YPD-Platte übertragen. Nach achtstündiger Inkubation bei 30°C erfolgte der Transfer der gepaarten Zellen mittels Stempelwerkzeug auf SGal-Selektionsplatten, die 2 Tage bei 30°C inkubiert wurden. Danach wurde eine weitere Übertragung auf SGal-Platten mit anschließender zweitägiger Inkubation bei 30°C durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen auf SGal-5-FOA-Platten (0,69% (w/v) *Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren (Formedium, Norwich, UK)* supplementiert mit 2 ml *Histidin-* sowie je 3 ml *Lysin- und Leucin-Stammlösung*; 50 mg/l *Uracil*; 0,1% (w/v) *5-FOA*; 2% (w/v) *Galaktose*; 2% (w/v) *Agar-Agar*) überstempelt und weitere 2-3 Tage inkubiert. Die resultierenden Zellareale enthielten nun ausschließlich Zellen mit Rezipientengenom, was mit Hilfe von geeigneten Selektivmediumplatten überprüft wurde.

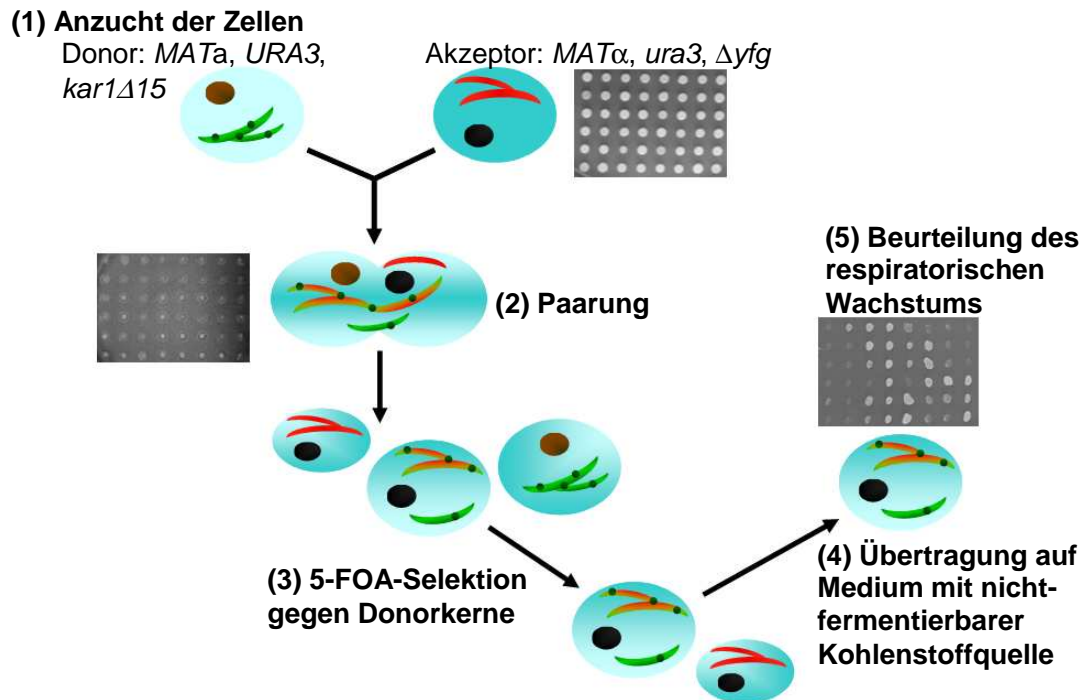


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Cytoduktion. (1) Anzucht von Donorzellen mit intakten Mitochondrien (grün) und intakter mtDNA (dunkelgrüne Punkte) sowie von Akzeptorzellen (hier mit funktionsunfähigen, DNA-freien Mitochondrien in rot). (2) Donor und Akzeptorzelle bilden im Zuge einer unvollständigen Paarung ein Heteroplasmon (gemischtes Cytoplasma) aus und übertragen cytoplasmatische Komponenten, u. a. Mitochondrien. Parallel kann es zu mitochondrialen Fusionsereignissen kommen, während denen funktionsfähige Moleküle und auch mtDNA ausgetauscht werden (orangefarbene Organellen). (3) Aufgrund des wildtypischen *URA3*-Gens, dessen kodiertes Protein 5-FOA in ein Zelltoxin umsetzt, sterben alle Zellen mit Donorkernen (braun). (4) Die Zellen werden abschließend auf YPG-Platten transferiert, um auf wieder gewonnene respiratorische Kompetenz zu testen (5).

2.2.5 Komplementations-Test

Dieser Test beruht auf der Herstellung diploider Zellen und ermöglicht es, das Vorhandensein bzw. den Verlust von mtDNA direkt zu erfassen. Die zu untersuchenden Stämme wurden analog 2.2.7.1 mit dem mtDNA-defizienten Stamm *Δmip1* (mitochondriale DNA-Polymerase; Foury, 1989) gekreuzt. Nach Überstempeln auf YPG-Platten wurde das Wachstum der diploiden Klone beurteilt. Im diploiden Zustand sollte das *Δmip1*-Genom die Deletion des Eltern-Teststammes komplementieren (und umgekehrt). Besaß dieser nun mtDNA, so war Wachstum auf YPG möglich. Das Erscheinen von Kolonien ließ somit einen direkten Rückschluss auf die Präsenz von mtDNA im Eltern-Teststamm zu.

2.2.6 Hefe Adaptionsversuch

Die identifizierten *pet*-Stämme wurden auf YPD-Platten angezogen, seriell auf zwei YPG-Platten mit 0,1% (w/v) Glukose überstempelt und jeweils 2 d bei 30°C inkubiert. Der

zusätzliche Anteil an fermentierbarer Kohlenstoffquelle im YPG-Medium ermöglichte ein erleichtertes Anwachsen der Stämme und die langsame Anpassung an die Notwendigkeit zu Atmen. Dadurch wurde es möglich, innerhalb der *pet*-Kulturen auf Individuen mit rudimentärer Atmungskompetenz zu selektieren. Abschließend wurden die Stämme auf reine YPG-Platten überführt und ihr Wachstum nach 3 d bei 30°C erfasst. Als „trainierbar“ wurden Deletionsstämme eingestuft, bei denen mindestens eine Kolonie zu beobachten war.

2.2.7 Herstellung von Doppelmutanten

2.2.7.1 Herstellung diploider Hefestämme

Um über Tetradenanalysen Doppelmutanten herzustellen, wurden zunächst diploide Stämme benötigt, die über Kreuzung der entsprechenden Haploiden entgegengesetzten Paarungstyps erzeugt wurden. Dafür wurden die haploiden Zellen strichförmig auf zwei verschiedene YPD-Platten ausgebracht, üN bei 30°C inkubiert und für die Paarung über Kreuz auf eine frische YPD-Platte überstempelt. Nach einer weiteren üN-Inkubation wurden die Zellen auf Selektivmediumplatten überführt, deren Supplementation ausschließlich das Wachstum diploider Zellen zuließ (im Fall von BY-Kreuzungen also SD mit Histidin, Leucin und Uracil). Diese waren nach 1-2 d bei 30°C deutlich an der Kreuzungsstelle zu sehen und wurden im Reinigungsausstrich auf frische SD-Platten überführt und 2-3 d bei 30°C angezogen.

2.2.7.2 Sporulation und Tetradendisektion

Da diploide Hefezellen des BY-Stammhintergrunds in der Regel nur mäßig sporulieren, wurde das speziell dafür entwickelte GNA-Protokoll von Riles & Curtis (http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/spo_riles) verwendet. Zunächst wurden durch Kreuzung hergestellte, diploide Zellen auf zwei aufeinanderfolgenden GNA-Platten (3% (w/v) *Nutrient Broth* (Difco, Lawrence, USA); 1% (w/v) *Hefe Extrakt* (Difco, Lawrence, USA); 5% (w/v) *Glukose*; 2% (w/v) *Agar-Agar*) jeweils üN bei 30°C inkubiert. Danach wurden 2 ml Flüssig-Sporulationsmedium (1% (w/v) *Kaliumacetat*; 0,005% (w/v) *Zinkacetat*; $\frac{1}{4}$ der normalerweise hinzugefügten Aminosäure-Menge) mit den Zellen beimpft und zunächst 5 d bei RT und anschließend 3 d bei 30°C geschüttelt. Nach dieser Zeit wurde der Anteil an Tetraden lichtmikroskopisch überprüft. Waren nur wenig sporulierende Zellen (< 10%) vorhanden, wurde die Inkubation bei 30°C um weitere 2 d verlängert. Bei ausreichender Anzahl wurden 270 µl der Sporulationskultur mit 30 µl Zymolyase 20T-Lösung (10 mg/ml; Seikagaku

Corporation, Tokio, Japan) gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Jeweils 100 µl der Suspension wurden strichförmig auf YPD-Platten aufgetragen. Mit Hilfe eines Mikromanipulators (Schuett Labotechnik, Göttingen; Nikon Eclipse 50i; Nikon Instruments, Düsseldorf) wurden Tetraden dissektiert und die Platten etwa 3 d bis zum Erscheinen von Kolonien bei 30°C bebrütet. Zur Vermehrung der Zellmasse wurden die vier gekeimten Sporen jeder Tetrade auf frischen YPD-Platten angezogen. Die Identität der Tetraden wurde über YPD-G418- und SD-Platten (ohne Methionin bzw. Lysin) überprüft. Bei Tetraden mit Doppelmutanten war auf allen Testplatten ein 2:2-Aufspaltungsverhältnis zu erwarten. Mögliche Doppelmutanten wurden zusätzlich durch PCR-Nachweise der deletierten Gene verifiziert.

2.2.8 Herstellung von Glycerin-Stocks

Zellen wurden bis zu zwei Monate bei 4°C auf Medienplatten aufbewahrt. Für eine längere Lagerung wurden Hefe- und Bakterienstocks in 15% (v/v) Glycerin mit frischen Kulturen von Medienplatten oder aus Flüssigmedium hergestellt. Im ersten Fall wurden 1,5 ml einer 15%igen (v/v) Glycerinlösung in geeigneten Schraubröhrchen vorgelegt und von Platte entnommenes Zellmaterial (etwa 1 cm² Zellen) darin resuspendiert. Alternativ wurden 750 µl 30%ige (v/v) Glycerinlösung und 750 µl Flüssigkultur gemischt. Die so vorbereiteten Stocks wurden bei -20°C vorgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3 Methoden der Zellbiologie

2.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Analysen

2.3.1.1 Anzucht von Hefezellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Die zu untersuchenden Hefezellen wurden in 1,5 ml des entsprechenden Flüssigmediums (YPD, YPG, YPGal, SD, SGal) üN bei 30°C angezogen, mit frischem Medium verdünnt und weitere 3-4 h bei 30°C inkubiert. Dabei sollte eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 1,0 nicht überschritten werden, um den Übergang in die stationäre Phase zu verhindern. Bei verlängerten Generationszeiten, wie sie häufig in YPG- und SGal-Flüssigmedium auftreten, wurden die Zellen in 1,5 ml Medium angeimpft und direkt ohne weiteres Verdünnen nach etwa 15-stündiger Inkubation mikroskopiert.

Alternativ wurden die Zellen nicht lebend mikroskopiert, sondern zunächst mit Formaldehyd fixiert. Hierfür wurden Zellen aus 1 ml Kultur durch Zentrifugation geerntet (1 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124), in 1 ml PBS (137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM

Kaliumchlorid, 19 mM Na_2HPO_4 , 1,7 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4) mit 4% (v/v) Formaldehyd (37%ige Stammlösung) resuspendiert und 30 min bei 30°C inkubiert. Für die Mikroskopie wurden die Zellen abzentrifugiert (1 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124) und in 1 ml frischem PBS resuspendiert.

2.3.1.2 Färbung subzellulärer Strukturen in *S. cerevisiae* für die Fluoreszenzmikroskopie

Färbung von Mitochondrien

Eine permanente, intrinsische Mitochondrienfärbung in lebenden Zellen wurde durch GFP und RFP mit vorgeschalteten mitochondrialen Präsequenzen erreicht. Plasmide, die für entsprechende Proteinvarianten kodieren (Tab. 2-4), wurden mittels Transformation (2.2.4.1) in die zu untersuchenden Hefezellen eingebracht. GFP oder RFP wurde entsprechend des plasmideigenen Promotors konstitutiv oder induzierbar (z.B. durch Galaktose) exprimiert.

Alternativ können Mitochondrien auch durch den rot-fluoreszierenden Farbstoff Rhodamin-B-Hexylester (Molecular Probes, Eugene, USA) angefärbt werden. Dieser wird membranpotentialabhängig in die Mitochondrien aufgenommen und kann so zur selektiven Detektion dieser Organellen genutzt werden. Für die Färbung wurden pro 1 ml logarithmischer Zellkultur 7 µl einer wässrigen Rhodamin-B-Hexylester-Lösung (frische 1:100-fache Verdünnung aus 1 mM Stocklösung) zugegeben. Das Gemisch wurde vor der Mikroskopie 5 min bei RT auf dem Drehrad inkubiert.

Färbung mitochondrialer DNA mittels DAPI (Jones & Fangman, 1992)

Der fluoreszierende Nukleinsäureinterkalator DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) wird in der Zellbiologie zur Markierung von DNA verwendet. Vorbereitend wurden die aus 1 ml üN-Kulturen geernteten Zellen (1 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124) durch 5-minütige Inkubation in 700 µl Methanol fixiert und mit 1 ml PBS gewaschen. Für die eigentliche Färbung wurde das Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen, mit 1 µl DAPI-Stammlösung (1 mg/ml in ddH₂O) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Darauf folgten vier Waschschritte mit jeweils 1 ml PBS, wobei die Zellen jeweils durch einminütige Zentrifugation bei RT und 13.000 rpm (Sigma 1-15, Rotor 12124) wieder gewonnen wurden. Die fixierten und gefärbten Zellen wurden abschließend in 500 µl PBS resuspendiert und entweder sofort mikroskopiert oder bis zu 1 Woche bei 4°C gelagert.

Erfassung von Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) mittels DHR-Färbung

Dihydrorhodamin-123 (DHR; Molecular Probes, Eugene, USA) ist ein membranständiger Farbstoff, der durch ROS zu grün fluoreszierendem Rhodamin-123 oxidiert wird. Für die Färbung wurden 500 µl Hefekultur mit 1 µl DHR-Lösung (2,5 mg/ml in DMSO) versetzt und 2 h bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (*1 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124*), in 1 ml PBS gewaschen und in 50 µl PBS resuspendiert. Als Positivkontrolle einer vollständigen Färbung wurden H₂O₂-behandelte Wildtypzellen (dreistündige Vorinkubation der Zellen in YPD mit 10 mM H₂O₂) wie beschrieben gefärbt.

2.3.1.3 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Untersuchung verschiedener struktureller und physiologischer Eigenschaften von Hefezellen wurde die Fluoreszenzmikroskopie als wichtiges Hilfsmittel eingesetzt. Zu untersuchende Zellen wurden dabei in 0,5% (w/v) „Low Melting Point-Agarose“ auf dem Objektträger immobilisiert. Die Mikroskopie wurde an einem Axioplan 2 Mikroskop mit Plan-Neofluar 100x/1,30 NA Ph3 Öl-Objektiv (Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen) und HBO100 Quecksilberdampf Lampe durchgeführt. Digitale DIC- und Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer Evolution VF Mono Cooled-Kamera (Intas, Göttingen) aufgenommen und mit der Software „Image ProPlus 5.0“ sowie „ScopePro 4.5“ (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) bearbeitet. Alle verwendeten Fluorophore und die damit sichtbar gemachten Ziele sind Tab. 2-5 zu entnehmen. Des Weiteren sind die entsprechenden Filtersätze (Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen) angegeben. Die zugrunde liegenden Färbeprotokolle sind im vorangehenden Kapitel 2.3.1.2 beschrieben.

Tabelle 2-5: Verwendete Fluorophore mit dazugehörigen Zielen und Filtern

Ziel	Fluorophor	Filtersatz
Mitochondrion	mtGFP	Nr.09 (Anregung: 450-490 nm; Emission: >515 nm)
	mtRFP/ dsRed	Nr.15 (Anregung: 534-558 nm; Emission: >590 nm)
	Rhodamin-B-Hexylester	Nr.15
(mitochondriale) DNA	DAPI	Nr.01 (Anregung: 365/12 nm; Emission: 397 nm)
ROS	DHR	Nr.09

2.3.2 Elektronenmikroskopie

2.3.2.1 Anzucht der Hefezellen für die Elektronenmikroskopie

Hefezellen wurden in 1 ml Vorkulturen des entsprechenden Mediums (YPD, YPG oder SD) 8 h über Tag bei 30°C inkubiert und abends zum Beimpfen von 50 ml Hauptkulturen eingesetzt. Diese wurden üN unter Schütteln bei 30°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 inkubiert und anschließend für die Elektronenmikroskopie präpariert (2.3.2.2).

Bei der Verwendung von Zellen aus SGal-Medium für die Überexpression von *MDM33* wurde die Vorgehensweise leicht abgeändert, um die gewünschte Zelldichte zu erreichen. Zunächst wurden Vor- und Hauptkultur wie oben beschrieben in SD-Medium hergestellt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 wurden die Zellen pelletiert, zweimal mit SGal gewaschen (5 min; RT; 4.000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44) und schließlich in 50 ml frischem SGal aufgenommen. Für die vollständige Induktion des *GAL*-Promotors und die Ausbildung des Überexpressionsphänotyps (Wildtyp als Referenz) war eine weitere Inkubation von 10-14 h erforderlich.

2.3.2.2 Hefepräparation nach Bauer *et al.* (2001) und Einbettung von Hefezellen nach Spurr (1969)

Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (5 min; 4°C; 5.000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44) geerntet, mit 10 ml PBS gewaschen und durch 30-minütige Inkubation bei 4°C in 10 ml Fixierungspuffer (2% Glutaraldehyd, 1 mM CaCl₂ in 0,1 M Cacodylat-Puffer, pH 7,2) Aldehyd-fixiert. Nach drei Waschschritten mit jeweils 10 ml Cacodylat-Puffer (0,1 M Na-Cacodylat, pH 7,2), wurde die Zellwand für eine bessere Zugänglichkeit für Kontrastmittel abgelöst. Dazu wurden die Hefezellen mediumabhängig 10 bis 30 min bei Raumtemperatur in Tris-Sorbitol-Puffer (50 mM Tris, pH 7,5; 5 mM MgCl₂; 1,4 M Sorbitol) mit 0,5% (v/v) 2-Mercaptoethanol und 0,15 mg/ml Zymolyase 20T (Seikagaku Corporation, Tokio, Japan) inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min; 4°C; 5.000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44) vom Überstand abgetrennt und zweimal mit 10 ml Cacodylat-Puffer gewaschen. Der dritte Waschschriff wurde zur Volumenreduktion mit nur 2 ml Cacodylat-Puffer in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt (5 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124). Für die anschließende OsO₄-Fixierung wurde das Zellpellet zunächst in 0,5 ml 0,5% (w/v) Osmiumtetroxid gelöst, danach mit 0,5 ml 0,8% (w/v) Kaliumferrocyanid in ddH₂O versetzt und für 5 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit je 1 ml ddH₂O gewaschen (5 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124). Diese

Vorgehensweise wurde für eine vollständige Stabilisierung der Membranstrukturen und Färbung der Membranlipide wiederholt.

Die fixierten und gereinigten Zellen wurden für die Einbettung in Agarose im Verhältnis 1:1 (v/v) mit 2% (w/v) Agarose Typ IX versetzt. Das gehärtete Agarose-Zell-Gemisch wurde mit einer Rasierklinge in 1 mm³ große Blöckchen geschnitten, die in einem Reaktionsgefäß mit 2 ml 1% (w/v) Uranylacetat-Lösung überschichtet und 90 min bei Raumtemperatur oder üN bei 4°C inkubiert wurden. Nach Waschen mit 2 ml ddH₂O wurde die Zellen mit Hilfe eines Acetongradienten entwässert, indem die Blöckchen jeweils 15 min in 2 ml 25%, 50%, 70% und 96% Aceton (v/v in ddH₂O) und dreimal 20 min in 100% entwässertem Aceton p.a. inkubiert wurden. Für die darauffolgende Durchtränkung mit Spurr-Harz (40 ml bestehen aus: 26 g Nonenylsuccinicanhydrid (NSA), 10 g ERL-4221D, 6 g D.E.R. 736 und 0,4 g 2-Dimethylaminoethanol) wurden 1:3, 1:1 und 3:1 Spurr:Aceton-Gemische hergestellt. Die Inkubationszeit in der 1:3- und 3:1-Mischung betrug je 3-4 h. Dazwischen erfolgte ein üN Inkubationsschritt in Spurr:Aceton = 1:1. Danach wurden die Blöckchen zweimal für 3-4 h und üN in purem Spurr eingelegt. Zum Abschluss der Einbettung wurden die vorbereiteten Blöckchen in mit Spurr gefüllte Beam-Kapseln (BAL-TEC, Witten) gegeben, 3-4 h bei 40°C vorpolymerisiert und zur vollständigen Polymerisation 2-3 d bei 50°C im Trockenschrank inkubiert. Die ausgehärteten Harzstücke wurden aus den Plastikkapseln entnommen und wie unter 2.3.2.3 beschrieben weiter verarbeitet.

2.3.2.3 Trimmen, Schneiden und Nachkontrastierung

Mittels Diamantfräse und Trimmergerät EM TRIM (Leica, Bensheim) wurde überschüssiges Harz von den Hefezellen enthaltenden Blöcken entfernt. Anschließend wurden mit einem Diamantmesser (Diatome, Biel, Schweiz) im Ultramikrotom Leica Ultracut UCT (Leica, Bensheim) 50 nm-dicke Segmente abgetrennt und als Bänder von 4-5 Schnitten mit befilmten Kupfer-Lochgrids („slot grids“, 2x1 mm; Plano, Wetzlar) aufgenommen.

Die Nachkontrastierung der Proben erfolgte nach Reynolds (1963). Hierfür wurden die getrockneten Lochgrids für 10 min in 2% (w/v) Uranylacetat-Lösung, dreimal 1 min in ddH₂O, 3 min in Bleicitrat-Lösung (2,1 ml Natriumcitrat-Lösung: 4,12 g in 50 ml ddH₂O + 2,1 ml Bleinitrat-Lösung: 3,13 g in 50 ml ddH₂O + 0,8 ml 1 M NaOH) und weitere dreimal 1 min in ddH₂O inkubiert. Anschließend wurden die Grids mindestens 4 h auf einem Filterpapier getrocknet.

2.3.2.4 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Proben erfolgte bei 80 kV an einem EM 902 A Transmissions-Elektronenmikroskop mit Plattenkamera (Carl Zeiss SMT, Oberkochen). Die erhaltenen Negative (Kodak, Stuttgart) wurden entwickelt und mit 300 dpi mit einem ScanMaker i900 (Mikrotek, Overath) eingescannt.

2.3.2.5 Befilmen von Kupfer-Lochgrids

Für die Bildung eines gleichmäßigen Films wurden staubfreie Objektträger in 1%ige Pioloformlösung ((w/v) in Chloroform) gelegt und anschließend an der Luft getrocknet. Der Film wurde auf eine Wasseroberfläche überführt, mit Kupfer-Lochgrids („slot grids“, 2x1 mm; Plano, Wetzlar) belegt und mit Parafilm von der Oberfläche abgenommen. Nach dem Trocknen wurden die befilmten Lochgrids analog 2.3.2.3 verwendet.

2.4 Methoden der Proteinbiochemie

2.4.1 In vivo Markierung mitochondrialer Translationsprodukte

Das mitochondriale Translationsprofil verschiedener Hefedeletionsstämme wurde nach Westermann *et al.* (2001) erfasst. Hierbei wurden mitochondrial synthetisierte Proteine bei Hemmung der cytosolischen Translation selektiv radioaktiv markiert. Die zu untersuchenden Stämme wurden in 1,5 ml SD- oder SR-Medium (*S-Minimalmedium mit 2% (w/v) Raffinose*) 20 h üN bei 30°C inkubiert und danach zum Beimpfen von 50 ml-Hauptkulturen eingesetzt. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-2,0 wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (4°C; 10 min; 4.000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44) und mit frischem Medium auf eine OD₆₀₀ von 3,0 eingestellt. 250 µl dieser Zellsuspension wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zum Stoppen der cytosolischen Translationsaktivität mit 10 µl einer frisch hergestellten Cycloheximidlösung (7,5 mg/ml in Ethanol) versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 30°C wurden 8 µl Aminosäurelösung (2 mg/ml jeder Aminosäure außer Methionin) sowie 2 µl [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml; Hartmann Analytics, Braunschweig) hinzugefügt und der Reaktionsansatz 30 min bei 30°C geschüttelt. Danach wurde die radioaktive Markierung durch Zugabe von 0,5 mg/ml Chloramphenicol (65 mg/ml in Ethanol) mit 10-minütiger Inkubation bei 30°C beendet. Zusätzlich wurde davor 5 min mit 4,4 M „kaltem“ Methionin inkubiert, um radioaktive Abbruchfragmente zu komplettieren, die störendes Hintergrundsignal verursachen könnten. Die Zellen wurden durch Zentrifugation

(15 min; 4°C; 12.000 rpm; Hettich Mikrorapid/K, Rotor 1395) vom Reaktionsmix abgetrennt und in 500 µl ddH₂O resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 75 µl Lyselösung (1,85 M NaOH; 7,5% (v/v) 2-Mercaptoethanol) versetzt, gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Abschließend wurden die Proteine mittels TCA-Fällung abgetrennt. Dafür wurden die lysierten Zellen mit 600 µl 50% (w/v) TCA-Lösung gemischt und 30 min auf Eis inkubiert und 30 min zentrifugiert (4°C; 12.000 rpm; Hettich Mikrorapid/K, Rotor 1395). Das Pellet wurde mit eiskaltem Aceton gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 50 µl 1x Probenpuffer (2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin, 2% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,02% (w/v) Bromphenolblau, 60 mM Tris-HCl, pH 6,8) durch 30 min Schütteln bei RT aufgenommen. Jeweils 20 µl Probe wurden für die gelelektrophoretische Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.4.2) verwendet.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von radioaktiv markierten, mitochondrial exprimierten Proteinen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach Laemmli (1970). Für die Herstellung der Sammelgele (10 x 150 x 1 mm) wurden 5% (w/v) Acrylamid, 0,033% (w/v) Bisacrylamid, 60 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) und 0,1% (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) verwendet. Die Trenngele der Größe 90 x 150 x 1 mm bestanden aus 16% (w/v) Acrylamid, 0,1% (w/v) Bisacrylamid, 385 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) APS und 0,035% (v/v) des Polymerisationsstarters TEMED (Westermann *et al.*, 2001). Die Elektrophorese erfolgte in einer senkrechten Kammer mit 1x SDS-Laufpuffer (0,1% SDS, 192 mM Glycin, 25 mM Tris) bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA. Anschließend wurden die Proteine auf Nitrocellulosemembranen übertragen (2.4.3).

2.4.3 Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran (Western-Blot) und Autoradiographie

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden im „semi-dry“-Blotverfahren (Towbin *et al.*, 1979) auf Nitrocellulosemembranen (Hybond; Amersham Biosciences, Piscataway, USA) übertragen, um sie für die Autoradiographie zugänglich zu machen. Dafür wurden die Nitrocellulosemembran und sechs Whatman-Filterpapiere für 20 min in Transferpuffer (39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,037% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol) getränkt. Drei der angefeuchteten Filterpapiere wurden auf die untere Graphitelektrode (Anode) gelegt. Darauf

folgten die Nitrocellulosemembran, das SDS-Gel und die verbleibenden drei Whatman-Papiere. Für die Übertragung wurde Strom der Stärke $1,5 \text{ mA/cm}^2$ für 1,5 h angelegt. Zur Kontrolle der Transfereffizienz und zur Markieren des Standards wurden die Proteine durch 2-minütige Inkubation der Membran in Poncaeu S-Lösung (0,5% (w/v) *Ponceau S*, 18 mM *TCA*) sichtbar gemacht. Eine selektive Detektion der radioaktiv markierten Proteinspezies wurde mittels Autoradiographie erreicht. Die aufgelegten Röntgenfilme (Fuji medical X-ray film Super RX; Fuji, Düsseldorf) wurden nach 2-5tägiger Exposition entwickelt und ausgewertet.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Genetische Basis von respiratorischem Wachstum, mitochondrialem Genom-Erhalt und mitochondrialer Proteinsynthese in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Gewinnung von Energie über die oxidative Phosphorylierung ist die Grundlage des höheren eukaryotischen Lebens und wurde deshalb eingehend erforscht. Als besonders geeigneter Modellorganismus erwies sich die Bäckerhefe *S. cerevisiae*, weil sie als fakultativer Anaerobier in der Lage ist, ihren Energiebedarf ausschließlich über Fermentation zu decken. Dadurch sind respiratorisch inkompetente Mutanten lebensfähig, solange fermentierbare Kohlenstoffquellen (z. B. Glukose) zur Verfügung stehen. Allerdings bilden sie bereits bei Limitierung fermentierbarer Kohlenstoffquellen kleinere Kolonien aus als Wildtypzellen, was mit dem Begriff *petite* (*pet*) beschrieben wird (Ephrussi *et al.*, 1949). Entsprechende respiratorisch inkompetente Mutanten werden deshalb als *pet*-Mutanten und beteiligte Gene als *pet*-Gene bezeichnet. Durch Hefestudien konnten bereits Ende des letzten Jahrhunderts mehr als 100 atmungsrelevante Gene gefunden werden (Tzagoloff & Dieckmann, 1990; Contamine & Picard, 2000). Die Verfügbarkeit kommerziell erwerblicher Deletionsbibliotheken, die Deletionsmutanten fast aller 4800 nicht-essentieller Hefegene enthalten, eröffnet heute die Möglichkeit, durch genomweite Analysen ein umfassendes Bild atmungsrelevanter Gene und Prozesse zu erhalten.

3.1.1 Durchmusterung einer Hefedeletionsbibliothek nach Mutanten mit Wachstumsdefekt auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle

3.1.1.1 Vergleichende Gendeletionsanalyse

In zwei vorangegangenen Arbeiten wurden käuflich erwerbliche Deletionsbibliotheken nicht-essentieller Hefegene verwendet, um *pet*-Mutanten bzw. *pet*-Gene umfassend zu identifizieren. Durch Dimmer *et al.* (2002) wurden so 341 *pet*-Mutanten innerhalb der homozygot diploiden Bibliothek gefunden. Luban *et al.* (2005) isolierten 355 *pet*-Mutanten aus der *MATa*-Deletionsbibliothek. Obwohl beide Stammsammlungen aus den praktisch isogenen Stämmen BY4743 bzw. BY4741 (Brachmann *et al.*, 1998) konstruiert worden waren, stimmten die gewonnenen Datensätze nur partiell überein: Nur etwa 2/3 (240) der *pet*-Gene waren in beiden zu finden (Abb. 3-1 A). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb ein dritter Datensatz gewonnen werden, um die beobachteten Abweichungen und ihre

molekularen Grundlagen in weiterführenden Experimenten zu untersuchen. Hierfür wurde die ~4800 Hefestämme umfassende *MAT* α -Deletionsbibliothek (BY4742; ebenfalls isogen zu den beiden anderen verwendeten Bibliotheken; Giaever *et al.*, 2002; Kastenmayer *et al.*, 2006) analog zu den beiden vorangegangenen Durchmusterungen auf Vollmediumplatten mit Glycerin als Kohlenstoffquelle (YPG) ausgebracht. Nach 6 d wurde die Fähigkeit zu respiratorischem Wachstum beurteilt. In der *MAT* α -Deletionsbibliothek waren demnach 319 respiratorisch inkompetente Mutanten enthalten, was 319 *pet*-Genen entspricht (Tab. A1).

Durch einen Vergleich mit den Ergebnissen von Dimmer *et al.* (2002) und Luban *et al.* (2005) wurden 176 Gene ermittelt, die in allen drei Durchmusterungsverfahren als *pet*-Gene identifiziert wurden (Abb. 3-1 B). Hierbei handelt es sich offensichtlich um *pet*-Gene, deren Deletionen stets zur respiratorischen Inkompetenz führen. Im Folgenden werden diese als hoch penetrant bezeichnet. Darüber hinaus waren 125 Gene in zwei von drei Datensätzen bzw. 237 Gene in nur einem Datensatz zu finden. Dabei ist zu beachten, dass 19 der Gene aus den beiden letztgenannten Gruppen nicht in allen, sondern nur in einer oder zwei der durchmusterten Bibliotheken enthalten waren.

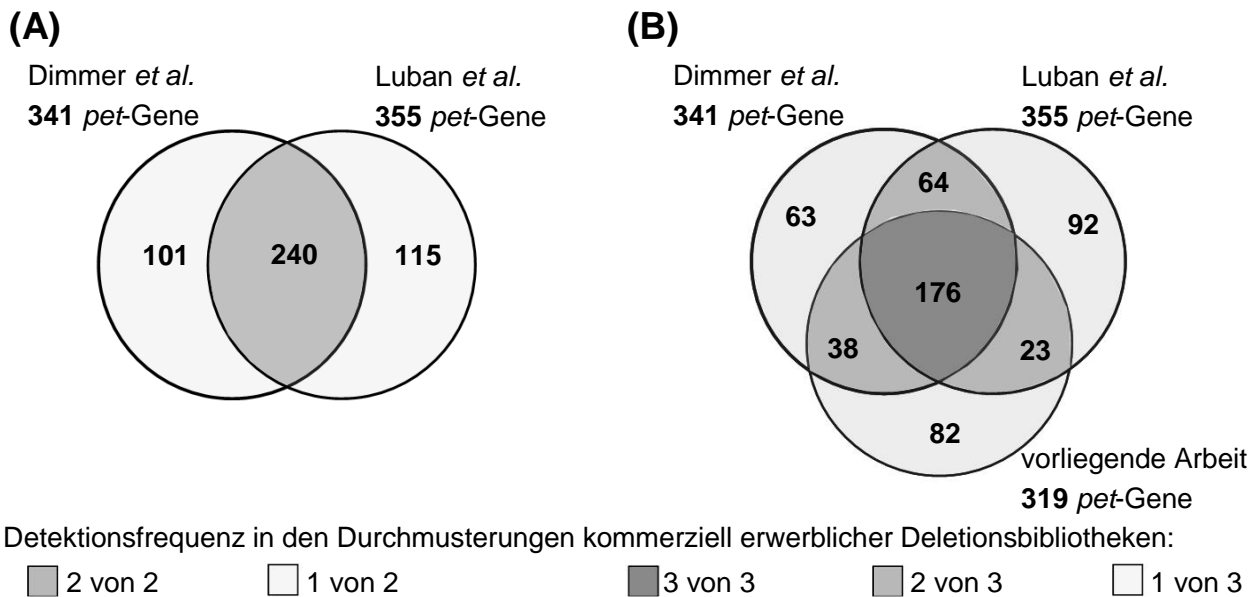


Abbildung 3-1: Verteilung nukleärer *pet*-Gene in den untersuchten Deletionsbibliotheken. (A) Die im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführten Durchmusterungen von Deletionsbibliotheken nach *pet*-Mutanten (Dimmer *et al.*, 2002 und Luban *et al.*, 2005) zeigen eine Übereinstimmung von nur 2/3. (B) Unter Einbeziehung des im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Datensatzes wird eine noch größere phänotypische Plastizität deutlich. Gleichzeitig lässt sich eine Gruppe von 176 Genen als hoch penetrante *pet*-Gene erfassen, deren Deletion in allen Fällen zur Ausprägung eines *pet*-Phänotyps führt (nach Merz & Westermann, 2009).

Um einen besseren Einblick in die molekularen Grundlagen der respiratorischen Inkompetenz zu erhalten, wurden alle hier identifizierten 319 *pet*-Gene gemäß ihres Auftretens in den drei

pet-Screens sowie der intrazellulären Lokalisation und Funktion ihrer Genprodukte gruppiert (Tab. A2). Hierfür wurden Daten aus der *Saccharomyces* Genome Database (SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002) oder aus manuellen Annotationen verwendet. Abb. 3-2 fasst die Ergebnisse graphisch zusammen. 73,3% der hoch penetranten *pet*-Gene (129 von 176) kodieren mitochondrial lokalisierte Proteine. Im Fall der zwei- von dreimal detektierten Gene ist der Anteil an mitochondrial lokalisierten Genprodukten auf 52,1% reduziert. Eine noch deutlichere Senkung des Anteils auf 14,7% ist für die nur in einer Durchmusterung identifizierten *pet*-Gene zu verzeichnen (Abb. 3-2 A). Es besteht also eine deutliche Korrelation zwischen der Penetranz des *pet*-Phänotyps und der mitochondrialen Funktion.

Unter Berücksichtigung der Funktionen der durch die 176 hoch penetranten *pet*-Gene kodierten Proteine wird deutlich, dass ein Großteil für den Erhalt und die Expression des mitochondrialen Genoms (78) sowie die Assemblierung der Atmungskette (24) benötigt wird (Abb. 3-2 B). 13 ORFs sind vermutlich nicht proteinkodierend, weil sie mit anderen bekannten Genen überlappen. Damit beträgt die Anzahl der proteinkodierenden hoch penetranten *pet*-Gene *de facto* 163.

Acht der hoch penetranten *pet*-Gene (*YDR065w*, *YGR150c*, *YJL046w*, *YLL033w*, *YLR091w*, *YMR293c*, *YOR305w* und *YPR116w*) kodieren für bisher uncharakterisierte Proteine. Außerdem wurden zwei zusätzliche ORFs (*YNL213c* und *YJL062w-a*) identifiziert, die nur in der vorliegenden *MAT α* -Bibliothek enthalten waren, aber durch anderweitige Studien (Wysocki *et al.*, 1999; Kastenmayer *et al.*, 2006) als *pet* bestätigt sind. Alle zehn entsprechenden Deletionsstämme wurden mittels PCR verifiziert. Damit wurde eine Gruppe von zehn interessanten Genen identifiziert, die *RRG1* bis *RRG10* genannt wurden. Bei ihren Produkten handelt es sich um neue Faktoren, die für den Erhalt der respiratorischen Kompetenz benötigt werden (*required for respiratory growth*).

Annähernd alle hier identifizierten Deletionsmutanten hoch penetranter *pet*-Gene (95%) zeigten auch in anderen Analysen des gesamten Genpools an Hefedeletionsmutanten (Steinmetz *et al.*, 2002; Prokisch *et al.*, 2004) reduzierte Fitness auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle. Im Unterschied zu Steinmetz *et al.* (2002), wo ein vergleichsweise großer Satz an potentiell atmungsrelevanten Genen gefunden wurde (466 Gene; 43,1% mit mitochondrialen Genprodukten), ist die hier vorgenommene vergleichende Gendeletionsanalyse wesentlich selektiver (176 Gene; 73,3% mit mitochondrialen Genprodukten).

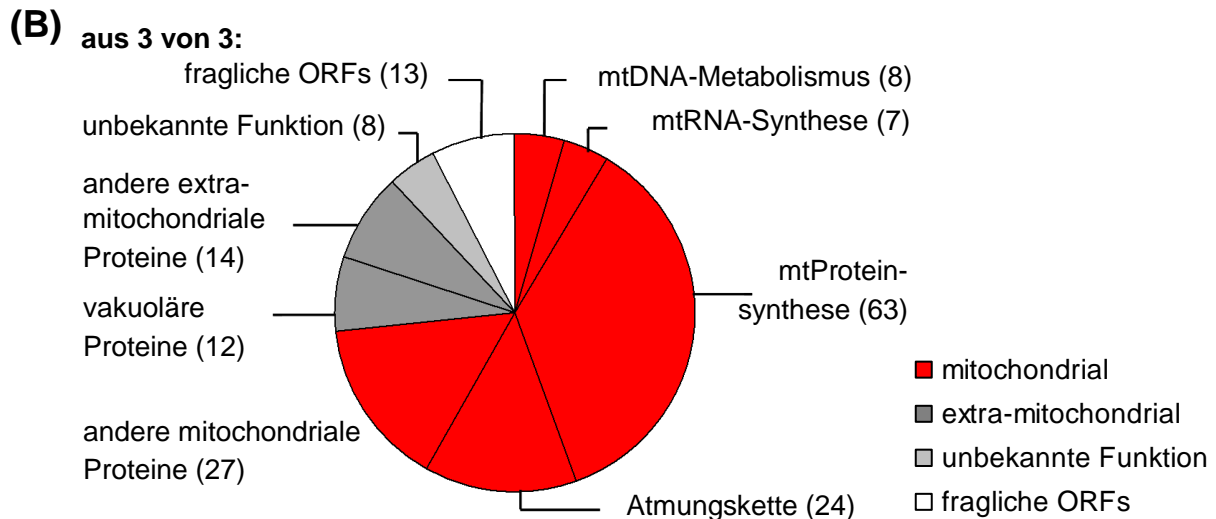
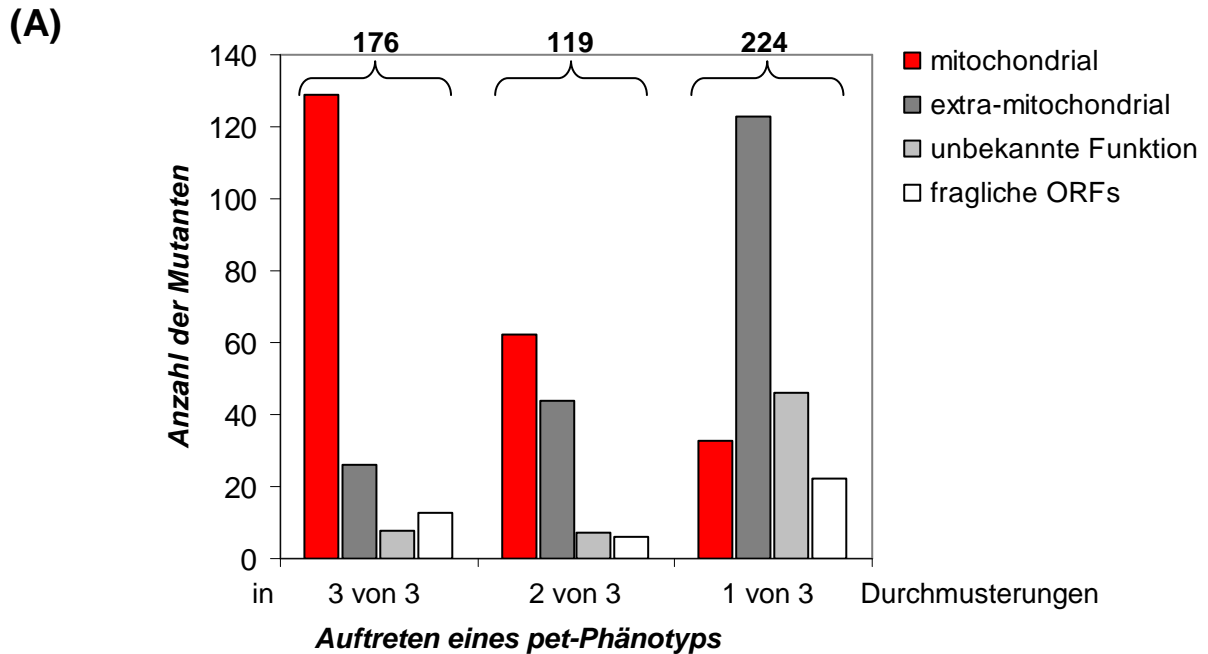


Abbildung 3-2: Funktionelle Gruppierungen der nukleären *pet*-Gene. (A) Die intrazelluläre Lokalisation der von *pet*-Genen kodierten Proteine wurde mit dem Auftreten ihrer Gene in den drei Durchmusterungen der Deletionsbibliotheken ins Verhältnis gesetzt (vgl. Tab. A2). Dadurch wird eine Korrelation zwischen mitochondrialer Funktion und Häufigkeit der Detektion deutlich. Der Anteil an mitochondrialen Proteinen ist innerhalb der Gruppe der hoch penetranten *pet*-Gene (3/3) am größten. **(B)** Überblick über die zellulären Funktionen der von hoch penetranten *pet*-Genen kodierten Proteine. Die zugrundeliegenden Daten entstammen der *Saccharomyces* Genome Database (SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002) und manuellen Annotationen (nach Merz & Westermann, 2009).

3.1.1.2 Aussagekraft der Ergebnisse

Die vergleichenden Untersuchungen lieferten 163 proteinkodierende, hoch penetrante *pet*-Gene und spiegeln zudem eine erstaunliche Plastizität des *pet*-Phänotyps wider. Für die zugrundeliegenden Unterschiede im Wachstumsverhalten von Deletionsstämmen aus verschiedenen Bibliotheken sind grundsätzlich zwei verschiedene Ursachen denkbar. Zum

einen können Bibliotheken falsche Stämme enthalten (wie teilweise von uns und anderen Arbeitsgruppen beobachtet). Zum anderen könnten einige Deletionsstämme über die Zeit auch Eigenschaften erwerben bzw. Funktionen verlieren. Um dies zu unterscheiden, wurden als Stichprobe die Genotypen von 39 Mutanten aus der *MAT α* -Bibliothek mittels PCR überprüft. Generell ist es wahrscheinlicher, dass ein spezifischer Phänotyp verdeckt wird, als dass er zufällig neu entsteht. Inkorrekte Mutanten sollten deshalb besonders häufig innerhalb der Gruppe von Stämmen zu finden sein, die in zwei von drei Bibliotheken *pet* sind. Demzufolge waren 19 der 39 zufällig ausgewählten Mutanten solche, die in der *MAT α* -Bibliothek respiratorisch kompetent waren, aber in der homozygot diploiden und der *MAT α* -Bibliothek *pet*. Sechs davon (*Δ yal012w*, *Δ ybl038w*, *Δ yd1202w*, *Δ ydr268w*, *Δ yor205c*, *Δ ypl029w*) besaßen ausschließlich das Wildtypgen, sieben (*Δ ydr231c*, *Δ ydr332w*, *Δ yjl036w*, *Δ yjr090c*, *Δ ymr066w*, *Δ ypr047w*, *Δ ypr124w*) trugen sowohl Wildtyp- als auch Deletionsallel und weitere sechs Mutanten (*Δ yal047c*, *Δ ybr163w*, *Δ ydr323c*, *Δ ykl148c*, *Δ yml081c-a*, *Δ yml129c*) wiesen den korrekten Deletionsgenotyp auf. Zusätzlich wurden auch zehn Mutanten überprüft, deren *pet*-Phänotyp nur in der *MAT α* -Bibliothek, nicht aber in den beiden anderen zu detektieren war und weitere zehn Mutanten, die in allen drei Screens *pet* waren. Alle 20 Deletionsstämme besaßen den korrekten Genotyp. Das heißt, dass jedes Mal, wenn eine falsche Deletion detektiert wurde, der *pet*-Phänotyp durch die Präsenz des Wildtypallels verdeckt wird. Im Gegensatz dazu waren alle getesteten, respiratorisch inkompetenten Mutanten genotypisch richtig. Daraus kann gefolgert werden, dass ein gewisser Anteil an Unstimmigkeiten zwischen den *pet*-Screens bzw. den zugrundeliegenden Bibliotheken tatsächlich auf falsche Stämme zurückzuführen ist. Gleichzeitig zeigt sich aber deutlich, dass eine relativ große Anzahl an bewiesenermaßen korrekten Mutanten Wachstumsunterschiede aufweist. Die vorgenommenen PCR-Analysen demonstrieren also eine phänotypische Plastizität von *pet*-Mutanten. Des Weiteren ist die beobachtete Korrelation zwischen *pet*-Phänotyp und mitochondrialer Lokalisation ein klarer Hinweis darauf, dass die Variabilität nicht nur aufgrund falscher Stämme zustande kommt, sondern biologische Prozesse widerspiegelt.

3.1.2 Charakterisierung der identifizierten *pet*-Stämme durch funktionelle Tests

Ziel der Arbeit war nicht nur die Erfassung von *pet*-Genen, sondern auch das Herausarbeiten der molekularen Basis der respiratorischen Kompetenz. Im nächsten Schritt wurden deshalb alle 319 *pet*-Mutanten aus der *MAT α* -Bibliothek funktionellen Tests unterzogen. Dadurch

wurden die Mutanten funktionell gruppiert, was Aufschluss über die Beteiligung bestimmter Gene an fundamentalen Prozessen, wie z. B. dem Erhalt der mtDNA oder der mitochondrialen Translation lieferte. Abb. 3-3 bietet einen Überblick über die durchgeführten Experimente und eine Zusammenfassung der gewonnenen Ergebnisse. Erklärungen und Interpretationen sind dem folgenden Text zu entnehmen.

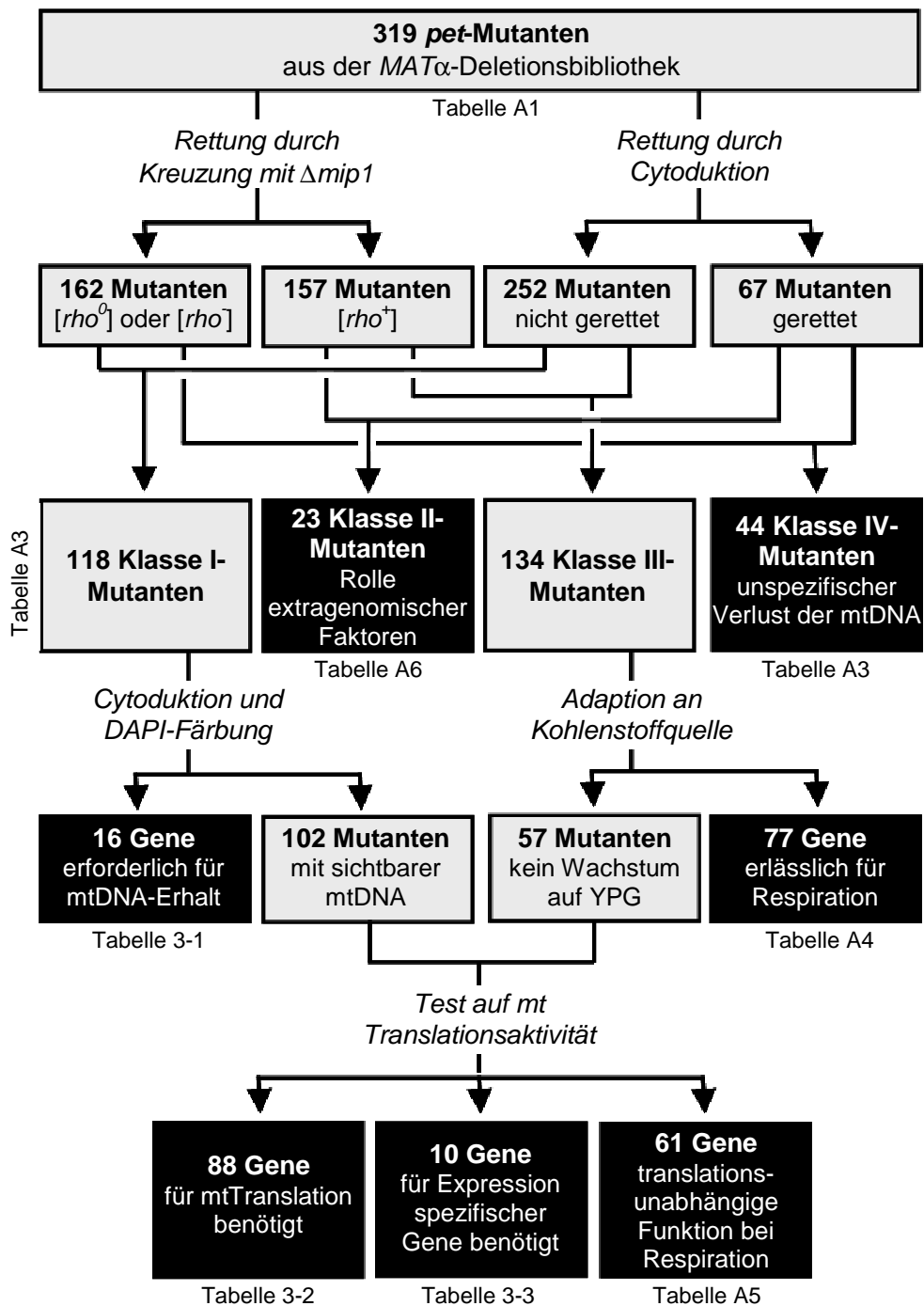


Abbildung 3-3: Zusammenfassung der systematischen funktionellen Analyse der aus der *MATα*-Bibliothek isolierten 319 *pet*-Mutanten. Graue Felder stellen Gruppen an Mutanten dar, die weiter analysiert wurden, und schwarze Felder enthalten den letzten Schritt der Auflösung der funktionellen Analysen. Detaillierte Beschreibungen sind dem folgenden Text zu entnehmen. Die Tabellen A1-5 sind im Anhang zu finden (nach Merz & Westermann, 2009).

3.1.2.1 Wiedergewinnung der respiratorischen Aktivität durch Kreuzung mit *Δmip1* und/oder Cytoduktion

Ein *pet*-Phänotyp wird häufig durch kompletten [*rho*⁰] oder partiellen [*rho*⁻] Verlust der mtDNA verursacht (Contamine & Picard, 2000). Deshalb sollte über einen Komplementationstest zunächst der Status der mtDNA in den *pet*-Mutanten erfasst werden. Hierfür wurden die zu untersuchenden Stämme mit dem Stamm *Δmip1* gekreuzt, in dem das Gen für die mitochondriale DNA-Polymerase deletiert ist und deshalb keine mtDNA vorliegt (Foury, 1989). Im diploiden Zustand werden die Deletionen beider Ausgangsstämme durch das jeweilige Partnergenom komplementiert. Wachstum auf YPG erfolgt aber trotzdem nur dann, wenn der *pet*-Paarungspartner intakte mtDNA zur Verfügung stellt. Dies ermöglicht eine direkte Aussage über die mtDNA-Situation im Teststamm. Nach der Kreuzung wurde für 157 heterozygot diploide Stämme eine wiedererlangte respiratorische Kompetenz festgestellt, sodass die entsprechenden parentalen *pet*-Stämme als [*rho*⁺] identifiziert werden konnten. 162 Stämme waren auch nach der Paarung nicht in der Lage auf Glycerin zu wachsen. Die entsprechenden *pet*-Stämme stellten demnach keine intakte mtDNA bereit, waren also [*rho*⁰] oder [*rho*⁻].

Über den Komplementationstest war nun zwar der momentane Status der mtDNA bekannt, allerdings lieferte er keinen Aufschluss darüber, ob ein *pet*-Gen-kodiertes Protein direkt am Erhalt der mtDNA beteiligt ist, oder ob es im Laufe der Zeit zu einem spontanen Verlust der mtDNA kam. Um dies zu unterscheiden, wurden die 319 *pet*-Mutanten mittels Cytoduktion mit [*rho*⁺]-Mitochondrien versorgt. Grundlage dieses Experiments ist die unvollständige Paarung zweier Hefezellen, wobei der Kernfusionsdefekt (*kar1Δ15* Mutation) des [*rho*⁺]-Donors lediglich die Vermischung des Cytoplasmas einschließlich aller darin enthaltenen Moleküle sowie Organellen zulässt, nicht aber die Verschmelzung der Zellkerne. Nach gezielter Selektion gegen das Donorgenom wurde das Wachstum der haploiden Nachkommen auf YPG untersucht. Für 67 *pet*-Mutanten wurde ein Wiedererhalt der respiratorischen Kompetenz nach der Cytoduktion beobachtet. Die restlichen 252 Stämme zeigten nach wie vor kein Wachstum auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle.

Durch Kombination der Ergebnisse aus *Δmip1*-Kreuzung und Cytoduktion ließen sich vier Klassen von *pet*-Mutanten unterscheiden (Abb. 3-4 und Tab. A3). Klasse I-Mutanten wurden weder durch Cytoduktion noch durch *Δmip1*-Kreuzung gerettet, wohingegen Klasse II-Mutanten in beiden Experimenten ihre respiratorische Kompetenz wieder erlangten. Als Klasse III definierte Mutanten wurden nur durch *Δmip1*-Kreuzung und Klasse IV-Mutanten schließlich nur durch Cytoduktion gerettet.

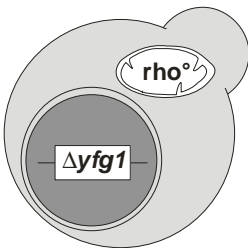
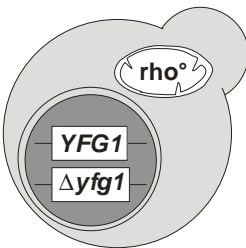
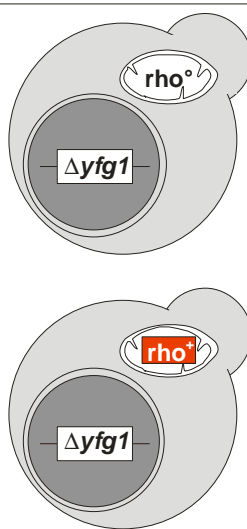
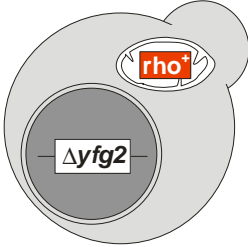
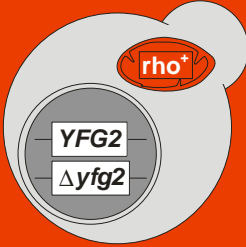

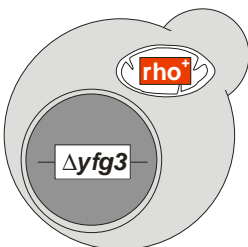
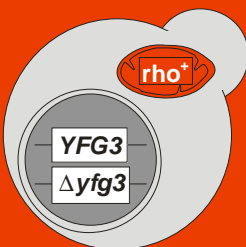
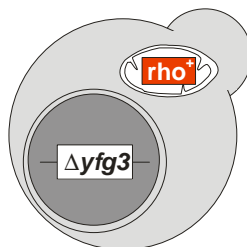
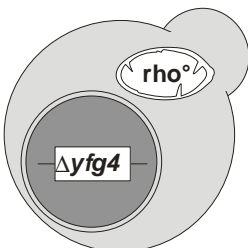
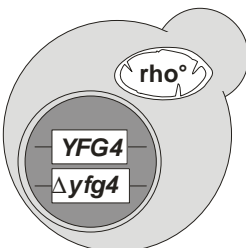
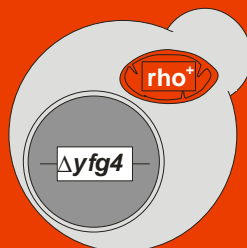
	parentale <i>pet</i> -Mutante	Kreuzung mit $\Delta mip1$	Cytoduktion
Klasse I			
Klasse II			
Klasse III			
Klasse IV			

Abbildung 3-4: Klassen an *pet*-Mutanten. Die Spalte „parentale *pet*-Mutante“ gibt den Genotyp der haploiden *pet*-Mutante aus der *MATα*-Deletionsbibliothek an. Die spezifische Deletion im Kerngenom ist dabei mit $\Delta yfg1$ bis 4 („your favourite gene“) benannt und der Status der mtDNA ist durch $[rho^+]$ (wildtypähnliches mitochondriales Genom; rot markiert) oder $[rho^0]$ (keine mtDNA; alternativ auch mit Schäden in der mtDNA $[rho^-]$) gekennzeichnet. Die Spalte „Kreuzung mit $\Delta mip1$ “ beschreibt den Genotyp der heterozygot diploiden Stämme nach dem Komplementationstest. In der Spalte „Cytoduktion“ sind die Genotypen der haploiden Deletionsmutanten nach Übertragung von $[rho^+]$ -Mitochondrien durch Cytoduktion angegeben. Respiratorisch kompetente Mitochondrien sind in rot und respiratorisch kompetente Hefezellen mit rotem Hintergrund dargestellt, respiratorisch inkompetente Mitochondrien und Zellen analog dazu in weiß. Klasse I-Mutanten besitzen nach der Cytoduktion entweder $[rho^+]$, $[rho^0]$ oder $[rho^-]$ Mitochondrien (nach Merz & Westermann, 2009).

Im Folgenden wurden die verschiedenen Klassen an *pet*-Mutanten mittels funktioneller Tests weiter charakterisiert. Alle 319 Deletionsstämme wurden nach Anpassung an die nicht-fermentierbare Kohlenstoffquelle durch YPG-Platten mit geringen Mengen an Glukose in zusätzlichen Wachstumsanalysen auf YPG untersucht (Adaptionsversuch). Zusätzlich wurden z. T. DAPI-Färbungen direkt nach der Cytoduktion vorgenommen, um auf Anwesenheit von mtDNA zu testen, und in einigen Fällen wurde die mitochondriale Proteintranslationsaktivität durch Markierung Cycloheximid-behandelter Zellen mit [³⁵S]-Methionin, SDS-PAGE und Autoradiographie erfasst. Indikationen für die Durchführung der beiden letztgenannten Testverfahren sind im jeweiligen Kapitel beschrieben.

3.1.2.2 Gene, die für den Erhalt der mtDNA benötigt werden

Die 118 Mutanten aus Klasse I waren [*rho*⁰] oder [*rho*⁻] und blieben auch nach dem Erhalt intakter Mitochondrien über Cytoduktion respiratorisch inkompetent. In dieser Gruppe befanden sich vermutlich Deletionsmutanten, denen essentielle Komponenten des mtDNA-Erhalts fehlen. Zusätzlich waren aber auch solche Mutanten enthalten, deren Deletionen einen primär mtDNA-unabhängigen *pet*-Phänotyp bedingen, aber gleichzeitig zu einem graduellen Verlust der mtDNA führen. Für eine Unterscheidung dieser beiden Subgruppen innerhalb der Klasse I-Mutanten wurden DAPI-Färbungen direkt nach der Cytoduktion durchgeführt, um auf Anwesenheit von mtDNA zu testen. In wildtypischen Zellen sind normalerweise 15-20 mtDNA-Nukleotide enthalten (Abb. 3-5 A). Abweichungen davon wurden erfasst. Zusätzlich zu diesen Ergebnissen wurden auch die Resultate aus dem Adaptionsversuch und der Analyse der mitochondrialen Translationsaktivität berücksichtigt.

Eine bekannte essentielle Komponente des mtDNA-Erhalts ist die mitochondriale DNA-Polymerase Mip1 (Foury, 1989). Bei Deletion des entsprechenden Gens waren nach der Cytoduktion >95% der DAPI-gefärbten Zellen ohne mtDNA und in den übrigen Zellen waren weniger als 5 Nukleotide enthalten (vergleichbar mit den in Abb. 3-5 B und C dargestellten Zellen). Dieser Phänotyp zeigte somit die Situation bei einem unmittelbaren Verlust der mtDNA und wurde als Definition für Gene herangezogen, die essentiell für den Erhalt der mtDNA sind. Zusätzlich sollten die entsprechenden Deletionsmutanten auch nach Adaption nicht auf YPG wachsen können und keine mtDNA-kodierten Proteine synthetisieren. Insgesamt entsprachen 16 Mutanten diesen Kriterien (Tab. 3-1). Die fehlenden Genprodukte wurden damit als wichtig für den Erhalt der mtDNA identifiziert.

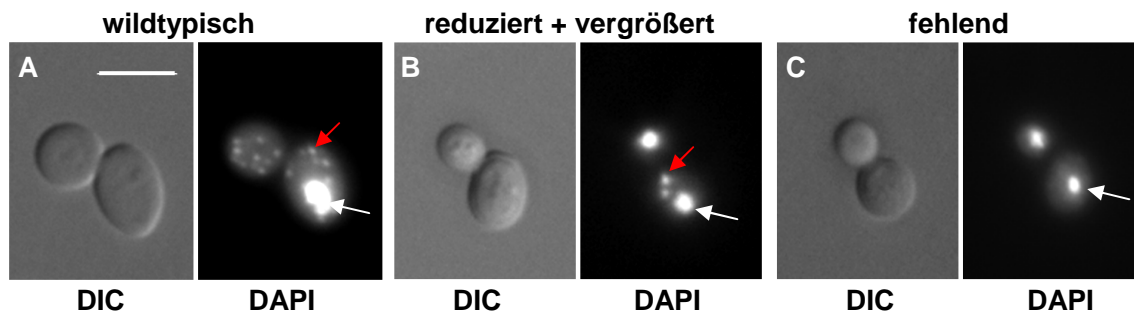


Abbildung 3-5: Exemplarische Darstellung wildtypischer, reduzierter und fehlender mitochondrialer DNA. Exemplarisch sind DAPI-gefärbte Wildtyp- (A), $\Delta mrpl4$ - (B) und $\Delta fzo1$ -Zellen (C) abgebildet. Die Zellen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und anschließend mit DAPI behandelt. Durch die Interkalation des Farbstoffs können das Kerngenom (weißer Pfeil) und die mtDNA-Nukleole (roter Pfeil) fluoreszenzmikroskopisch erfasst werden. Zusätzlich zu den Fluoreszenzaufnahmen (DAPI) sind Differential-Interferenz-Kontrast-Aufnahmen (DIC) dargestellt. Der abgebildete Größenbalken entspricht 5 μ m. In Wildtypzellen sind zwischen 15-20 mtDNA Nukleole pro Zelle enthalten. Die abgebildete $\Delta mrpl4$ -Deletionszelle (B) besitzt hingegen nur 2 Nukleole, die im Vergleich zu wildtypischen Nukleolen jedoch deutlich vergrößert sind, und in der gezeigten $\Delta fzo1$ -Zelle (C) fehlt die mtDNA völlig.

Unter den 16 Deletionsstämmen waren erwartungsgemäß solche, denen Komponenten mit bekannter Beteiligung am mtDNA-Metabolismus fehlen: die mitochondriale DNA-Polymerase Mip1 (Foury, 1989), die mitochondrialen DNA-Helikasen Hmi1 (Sedman *et al.*, 2000) und Pif1 (Lahaye *et al.*, 1991), Atp1, ein DNA-Reparaturprotein mit Aktivität im Zellkern und in den Mitochondrien (Vongsamphanh *et al.*, 2001), sowie Aconitase (Aco1), ein Enzym des Citratzyklus, das außerdem am mtDNA-Erhalt beteiligt ist (Chen *et al.*, 2005).

Sofortiger Verlust von mtDNA trat zudem in Zellen auf, denen die mitochondrialen Transkriptions- und Translationskomponenten Mrpl37, Mtf1, Mtg2, Rsm24 und Slm5 fehlen und in der Deletionsmutante des ORFs *YKL091w*, der mit *MRPL38* (kodiert ein mitochondriales Ribosomenprotein) überlappt. Bereits 1985 beobachteten Myers *et al.*, dass eine Blockierung der mitochondrialen Proteinsynthese den Verlust der mtDNA bedingen kann. Die Mechanismen dafür sind auch heute noch unklar. Die hier gesammelten Ergebnisse untermauern aber die Wichtigkeit der Proteinsynthesemaschinerie für den mtDNA-Erhalt.

Auch in der $\Delta atp4$ -Deletionsmutante, der die ATPase-Untereinheit b fehlt, erfolgte ein schneller Verlust der mtDNA. Dieser Befund stimmt mit früheren Ergebnissen überein (Paul *et al.*, 1989), wobei auch hier die molekulare Basis noch nicht verstanden ist (Duvezin-Caubet *et al.*, 2006). Des Weiteren führte das Fehlen von Pet100, einem Faktor der Cytochrom *c* Oxidase-Assemblierung, zu einem Verlust der mtDNA. Die Tatsache, dass in allen diskutierten Deletionsstämmen ein ebenso schneller Verlust der mtDNA wie in der $\Delta mip1$ -Mutante erfolgt, lässt auf eine aktive Unterdrückung der mtDNA-Replikation oder -Vererbung in diesen Stämmen schließen. Atp4, Mrpl37, Mtf1, Mtg2, Pet100, Rsm24 und Slm5 käme demnach eine aktive Rolle in der Regulation des mtDNA-Erhalts in Hefe zu.

Andere Faktoren der mtDNA-Vererbung sind die Proteine Mgm1, Doc1 und das neu identifizierte Protein Rrg5. Mgm1 ist ein dynaminähnliches Protein, das über seine Rolle als mitochondriale Fusionskomponente den mtDNA-Erhalt beeinflusst (Jones & Fangman, 1992; Merz *et al.*, 2007). Doc1 ist als ein Prozessivitätsfaktor an der Cyclin-Proteolyse beteiligt. In diesem Prozess wird das Protein für die Ubiquitinierungsaktivität des *Anaphase Promoting Complex* (APC) benötigt (Carroll & Morgan, 2002). Interessanterweise wurde Doc1 auch im mitochondrialen Proteom gefunden (Sickmann *et al.*, 2003; Reinders *et al.*, 2006). Möglicherweise verknüpft Doc1 die mtDNA-Replikation und/oder Vererbung mit dem Zellzyklus. Das *RRG5*-Gen (*YLR091w*) kodiert für ein Protein unbekannter Funktion und ohne Homologien zu charakterisierten Proteinen. Da Rrg5 wahrscheinlich in Mitochondrien vorliegt (Huh *et al.*, 2003; Sickmann *et al.*, 2003; Reinders *et al.*, 2006), könnte es sich dabei um einen neuen Faktor handeln, der essentiell für den Erhalt von mtDNA ist.

Tabelle 3-1: Für den Erhalt mitochondrialer DNA erforderliche Gene.

Systematischer Name	Standardname	Zelluläre Funktion des Genprodukts
Kodierend für bekannte Komponenten des mtDNA-Metabolismus		
<i>YKL114c</i>	<i>APN1</i>	in Nukleus und Mitochondrien an der DNA-Reparatur beteiligt
<i>YLR304c</i>	<i>ACO1</i>	Aconitase; zusätzlich für den Erhalt mitochondrialer DNA benötigt
<i>YML061c</i>	<i>PIF1</i>	in Nukleus und Mitochondrien aktive DNA-Helikase
<i>YOL095c</i>	<i>HMI1</i>	an der mitochondrialen Innenmembran lokalisierte DNA-Helikase
<i>YOR330c</i>	<i>MIP1</i>	katalytische Untereinheit der mitochondrialen DNA-Polymerase
Kodierend für bekannte Komponenten der mitochondrialen Transkription und Translation		
<i>YBR268w</i>	<i>MRPL37</i>	mitochondriales Ribosomenprotein
<i>YCR024c</i>	<i>SLM5</i>	mitochondriale AsparaginytRNA Synthetase
<i>YDR175c</i>	<i>RSM24</i>	mitochondriales Ribosomenprotein der kleinen Untereinheit
<i>YHR168w</i>	<i>MTG2</i>	assoziiert mit mitochondrialen Ribosomen; mögliche Rolle in deren Assemblierung
<i>YKL169c</i>		<i>dubious</i> ORF; überlappt partiell mit <i>MRPL38</i>
<i>YMR228w</i>	<i>MTF1</i>	mitochondrialer RNA-Polymerase Spezifitätsfaktor
Kodierend für Komponenten der oxidativen Phosphorylierung		
<i>YDR079w</i>	<i>PET100</i>	Faktor der Cytochrom c Oxidase-Assemblierung
<i>YPL078c</i>	<i>ATP4</i>	Untereinheit b der mitochondrialen F1Fo-ATP-Synthase
Andere Gene		
<i>YGL240w</i>	<i>DOC1</i>	nötig für die Ubiquitinierungsaktivität des <i>Anaphase Promoting Complex</i>
<i>YLR091w</i>	<i>RRG5</i>	unbekannte Funktion
<i>YOR211c</i>	<i>MGM1</i>	mitochondriale GTPase; beteiligt an der Fusion von Mitochondrien

Die Auflistung enthält systematische und Standardnamen von Genen, die für den Erhalt neu eingebrachter mtDNA in Klasse I *pet*-Mutanten benötigt werden. Angaben zu zellulären Funktionen der Genprodukte stammen aus der *Saccharomyces* Genome Database (SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002) oder manuellen Annotationen (nach Merz & Westermann, 2009).

Im Gegensatz zu den 16 diskutierten Deletionsstämmen kann für die 44 *pet*-Mutanten der Klasse IV eine direkte Beteiligung der fehlenden Proteine am mtDNA-Erhalt ausgeschlossen werden. Die entsprechenden Mutanten konnten zwar ebenfalls nicht über Kreuzung mit *Δmip1* gerettet werden, besaßen also aktuell keine mtDNA. Allerdings zeigte ihre Rettung über die Cytoduktion, dass sie prinzipiell in der Lage sind, neu eingebrachte mtDNA zu erhalten. Denkbar wäre, dass Mitglieder dieser Gruppe ihre mtDNA spontan verlieren, wenn sie längere Zeit auf fermentierbarer Kohlenstoffquelle gehalten werden. Interessanterweise wurden 77% der Klasse IV-Mutanten nicht in den Screens von Dimmer *et al.* (2002) und Luban *et al.* (2005) identifiziert. Daraus lässt sich schließen, dass viele der 44 Faktoren tatsächlich nur indirekt am Erhalt der respiratorischen Aktivität beteiligt sind.

3.1.2.3 Gene, die für die mitochondriale Proteintranslation benötigt werden

Als nächstes sollten die Gene identifiziert werden, deren Produkte an der mitochondrialen Proteinsynthese beteiligt sind. Hierfür wurde *in vivo* eine radioaktive Markierung mitochondrialer Translationsprodukte durchgeführt. Die Deletionsstämmen wurden auf fermentierbarer Kohlenstoffquelle (Glukose oder Raffinose) bis zur logarithmischen Wachstumsphase gezogen. Anschließend erfolgte eine Blockierung der cytosolischen Proteintranslation mittels Cykloheximidbehandlung. Neu synthetisierte Proteine waren demnach ausschließlich mitochondrialen Ursprungs und konnten selektiv mit [³⁵S]-Methionin markiert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert werden. Im Fall von wildtypischen Hefezellen wurden so die acht mitochondrial kodierten und exprimierten Proteine nachgewiesen: die Untereinheiten der F₁F₀-ATPase Atp6, Atp8 und Atp9, die Cytochrom *c* Oxidase-Untereinheiten Cox1, Cox2, Cox3, die Untereinheit Cob (= Cyt *b*) des Cytochrom *bc1*-Komplexes und das mitochondriale Ribosomenprotein Var1 (vgl. Abb. 3-6, Bahn 1) (Westermann *et al.*, 2001).

Um den Aufwand des Experiments zu begrenzen, wurden nur Stämme getestet, in denen gemäß der vorangegangenen Analysen potentiell Translationsdefekte möglich waren. Aufgrund ihrer Rettung durch die Cytoduktion, konnten Mutanten der Klassen II und IV als translationskompetent erfasst werden. Mutanten mit Defekt in der mitochondrialen Proteinsynthese waren also ausschließlich in den Klassen I und III zu erwarten. In Klasse I befinden sich Mutanten, die aufgrund inhibierter mitochondrialer Translation ihre mtDNA verloren haben, wohingegen in Klasse III solche enthalten sind, bei denen die Translation zwar blockiert, aber immer noch intakte mtDNA vorhanden ist. Um Klasse I-Mutanten aussagekräftig auf ihre mitochondriale Translationsaktivität testen zu können, wurden diese

zunächst über Cytoduktion mit frischer mtDNA versorgt. Danach war in 102 Mutanten mtDNA vorhanden. Die 16 Deletionsmutanten, bei denen ein sofortiger Wiederverlust der mtDNA eintrat (vgl. 3.1.2.2; Tab. 3-1), konnten nicht verlässlich untersucht werden. In einigen Klasse III-Mutanten entstand der *pet*-Phänotyp vermutlich durch einen synergistischen Effekt aus beeinträchtigten Mitochondrien und Katabolitrepression, die die Expression von atmungsrelevanten Genen reduziert (Gancedo, 1998). Um die Katabolit-repression aufzuheben, wurden die Zellen zunächst auf glyzerinhaltigem Medium mit zusätzlich begrenzter Menge an fermentierbarer Kohlenstoffquelle (3% Glycerin + 0,1% Glukose) gezogen und erst nach Adaption auf YPG-Platten überführt. Dadurch waren 77 Deletionsstämme in der Lage respiratorisch zu wachsen (Tab. A4). Die entsprechenden fehlenden Genprodukte sind also wahrscheinlich für eine Atmungsaktivität verzichtbar und spielen ebenfalls keine Rolle in der mitochondrialen Proteintranslation. Die verbleibenden 57 Deletionsstämme wurden weiter untersucht. Insgesamt wurde die mitochondriale Proteinsyntheseaktivität von 159 Deletionsmutanten (den verbleibenden Klasse I- und Klasse III-Mutanten) getestet.

Für die allgemeine mitochondriale Proteinsynthese benötigte Gene

In 88 Teststämmen konnte keine mitochondriale Translationsaktivität detektiert werden (exemplarisch Abb. 3-6, Bahn 2). Die entsprechenden Gene, bzw. Genprodukte, werden somit für die mitochondriale Proteinsynthese benötigt (Tab. 3-2).

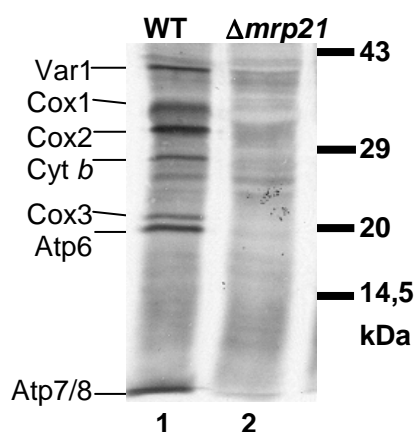


Abbildung 3-6: Exemplarische Erfassung der mitochondrialen Translation für WT- und $\Delta mrp21$ -Zellen. Hefezellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in Medium mit fermentierbarer Kohlenstoffquelle angezogen und nach Cykloheximidbehandlung mit [35 S]-Methionin markiert. Die erhaltenen Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Im Vergleich zu wildtypischen Hefezellen, die acht Proteine (vgl. Beschriftung am linken Bildrand) mitochondrial exprimieren, sind in der untersuchte Deletionsmutanten keine mitochondrialen Translationsprodukte vorhanden.

Als notwendig für die allgemeine mitochondriale Proteinsynthese wurden unter anderem 39 Untereinheiten der mitochondrialen Ribosomen und viele andere bekannte Komponenten der mitochondrialen Transkription, Translation und Assemblierung der Atmungskette (Towpik, 2005) erfasst. Zusätzlich wiesen einige Mutanten, denen Komponenten der mtDNA-

Vererbung fehlen, keine Proteinsyntheseaktivität auf. Dazu gehörten z. B. Fzo1 (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998), Mhr1 (Ling & Shibata, 2002), Msh1 (Reenan & Kolodner, 1992) und Mgm101 (Meeusen *et al.*, 1999). In DAPI-Färbungen unmittelbar vor der radioaktiven Markierung wurde zwar der zumindest rudimentäre Besitz von mtDNA bestätigt, allerdings ist es möglich, dass in diesen Stämmen (und auch in anderen Klasse I Mutanten) das mitochondriale Genom in der Zeit zwischen Cyto duktion und Markierungsreaktion gravierend geschädigt wurde und damit nicht mehr als funktionelle Matrize für die Proteinsynthese fungieren kann. Auch stammabhängige Effekte bezüglich der mitochondrialen Translationsleistung sind zu berücksichtigen. So wurden im hier verwendeten genetischen Hintergrund (BY4742) beispielsweise für $\Delta pet309$ keine Translationsprodukte detektiert, wohingegen bei Konstruktion der gleichen Mutante im W303 Stammhintergrund welche vorhanden waren (Zambrano *et al.*, 2007).

Zwei Stämme mit Deletionen fraglicher ORFs (*YDR114c* und *YNL184c*) wurden als translationsinkompetent identifiziert. Die entsprechenden ORFs überlappen mit zwei Genen, die für mitochondriale Ribosomenproteine kodieren und ebenfalls in dieser Gruppe erfasst wurden. Die fraglichen ORFs bestätigen damit gewissermaßen als intrinsische Kontrolle die gesammelten Ergebnisse. Weitere 5 Gene (*RRG1*, *YGR102c*, *RRG2*, *RRG6* und *RRG8*) kodieren bisher uncharakterisierte Proteine. Eine mögliche Rolle von Rrg1, Rrg2, Rrg6 und Rrg8 als neue Komponenten der mitochondrialen Proteinsynthese wird unter 3.1.2.5 diskutiert.

Tabelle 3-2: Für die mitochondriale Proteinsynthese erforderliche Gene.

Kodierend für mitochondriale ribosomale Proteine		
YBL090W/MRP21; YBR146W/MRPS9; YBR251W/MRPS5; YBR282W/MRPL27; YCR003W/MRPL32; YCR071C/IMG2; YDL045W-A/MRP10; YDR115W; YDR337W/MRPS28; YDR347W/MRP1; YEL050C/RML2; YER050C/RSM18; YGL129C/RSM23; YGR076C/MRPL25; YGR215W/RSM27; YGR220C/MRPL9; YHR147C/MRPL6; YJL063C/MRPL8; YJL096W/MRPL49; YKL003C/MRP17; YKL138C/MRPL31; YKL155C/RSM22; YKL170W/MRPL38; YKR006C/MRPL13; YKR085C/MRPL20; YLR312W-A/MRPL15; YLR439W/MRPL4; YMR158W/MRPS8; YMR188C/MRPS17; YMR193W/MRPL24; YMR286W/MRPL33; YNL081C/SWS2; YNL177C/MRPL22; YNL185C/MRPL19; YNL252C/MRPL17; YNR037C/RSM19; YOR150W/MRPL23; YOR158W/PET123; YPL173W/MRPL40		
Systematischer Name	Standardname	Zelluläre Funktion des Genprodukts
Kodierend für andere bekannte Proteine		
YBL019W	APN2	Klasse II Abasische (AP) Endonuklease mit Beteiligung an der DNA-Reparatur
YBR179C	FZO1	Transmembran-GTPase der mitochondrialen Fusion

Systematischer Name	Standard-name	Zelluläre Funktion des Genprodukts
<i>YDL044C</i>	<i>MTF2</i>	mitochondriales Protein mit Beteiligung an mRNA-Splicing und Proteinsynthese
<i>YDR194C</i>	<i>MSS116</i>	mitochondriale RNA-Helikase; Splicing von Gruppe II-Introns
<i>YDR296W</i>	<i>MHR1</i>	beteiligt an Reparatur, Rekombination und Erhalt der mtDNA
<i>YER145C</i>	<i>FTR1</i>	Eisen-Permease, die hochaffine Eisenaufnahme vermittelt
<i>YER154W</i>	<i>OXA1</i>	Komponente der mitochondrialen Protein-Export-Maschinerie
<i>YGL071W</i>	<i>RCS1</i>	Transkriptionsfaktor zur Regulation von Genen der Eisenaufnahme und der Zellgröße
<i>YGL143C</i>	<i>MRF1</i>	mitochondrialer Peptidketten- <i>release</i> Faktor
<i>YGR171C</i>	<i>MSM1</i>	mitochondriale Methionyl-tRNA-Synthetase
<i>YHL038C</i>	<i>CBP2</i>	mitochondrialer Splicing-Faktor
<i>YHR011W</i>	<i>DIA4</i>	tRNA-Synthetase, mögliche Rolle für mitochondriale Funktion
<i>YHR038W</i>	<i>RRF1</i>	mitochondrialer Ribosomen-Recycling Faktor
<i>YHR051W</i>	<i>COX6</i>	Cytochrom c Oxidase Untereinheit VI
<i>YHR091C</i>	<i>MSR1</i>	mitochondriale Arginyl-tRNA-Synthetase
<i>YHR120W</i>	<i>MSH1</i>	beteiligt an Reparatur mitochondrialer DNA
<i>YJL102W</i>	<i>MEF2</i>	mitochondrialer Translationselongationsfaktor
<i>YJL209W</i>	<i>CBP1</i>	benötigt für <i>COB</i> mRNA-Stabilität oder 5'-Prozessierung
<i>YJR144W</i>	<i>MGM101</i>	Protein zum Erhalt des mitochondrialen Genoms
<i>YKL016C</i>	<i>ATP7</i>	ATP-Synthase Untereinheit d
<i>YKL134C</i>	<i>OCT1</i>	mitochondriale Intermediat-Peptidase
<i>YKL194C</i>	<i>MST1</i>	mitochondriale Threonyl-tRNA-Synthetase
<i>YLR067C</i>	<i>PET309</i>	spezifischer Translationsaktivator für die <i>COX1</i> mRNA
<i>YLR069C</i>	<i>MEF1</i>	mitochondrialer Translationselongationsfaktor G
<i>YLR070C</i>	<i>XYL2</i>	Xylitol-Dehydrogenase
<i>YLR139C</i>	<i>SLS1</i>	beteiligt an mitochondrialem Metabolismus
<i>YLR295C</i>	<i>ATP14</i>	ATP-Synthase Untereinheit h
<i>YMR064W</i>	<i>AEP1</i>	benötigt für Akkumulation des Transkripts von <i>ATP9/OLI1</i>
<i>YMR089C</i>	<i>YTA12</i>	beteiligt an proteolytischer und Chaperon-Aktivität in der IM
<i>YMR097C</i>	<i>MTG1</i>	vermutlich beteiligt an Assemblierung der großen Ribosomen-untereinheit
<i>YMR098C</i>	<i>ATP25</i>	benötigt für Stabilität der <i>ATP9</i> mRNA
<i>YMR267W</i>	<i>PPA2</i>	mitochondriale inorganische Pyrophosphatase
<i>YMR287C</i>	<i>DSS1</i>	RNase zum <i>turnover</i> aberranter RNAs, assoziiert am Ribosom
<i>YNL073W</i>	<i>MSK1</i>	mitochondriale Lysyl-tRNA-Synthetase
<i>YOL033W</i>	<i>MSE1</i>	mitochondriale Glutamyl-tRNA-Synthetase
<i>YOR065W</i>	<i>CYT1</i>	Cytochrom c1
<i>YOR187W</i>	<i>TUF1</i>	mitochondrialer Translationselongationsfaktor Tu
<i>YPL097W</i>	<i>MSY1</i>	mitochondriale Tyrosyl-tRNA-Synthetase
<i>YPL104W</i>	<i>MSD1</i>	mitochondriale Aspartyl-tRNA-Synthetase
<i>YPL148C</i>	<i>PPT2</i>	aktiviert mitochondriales Acylcarrier-Protein
<i>YPL254W</i>	<i>HFI1</i>	Komponente des ADA-Komplexes
<i>YPL271W</i>	<i>ATP15</i>	Epsilon Untereinheit der F1-ATP-Synthase
Kodierend für unbekannte Proteine		
<i>YDR065W</i>	<i>RRG1</i>	unbekannte Funktion, mitochondrial
<i>YDR114C</i>		fraglicher ORF, überlappt mit <i>YDR115w</i>
<i>YGR102C</i>		unbekannte Funktion, mitochondrial
<i>YGR150C</i>	<i>RRG2</i>	unbekannte Funktion, mitochondrial
<i>YMR293C</i>	<i>RRG6</i>	unbekannte Funktion, mitochondrial
<i>YNL184C</i>		fraglicher ORF, überlappt mit <i>YNL185c</i>
<i>YPR116W</i>	<i>RRG8</i>	unbekannte Funktion, vermutlich mitochondrial

Die Auflistung enthält systematische und Standardnamen von Genen. Angaben zu zellulären Funktionen der Genprodukte stammen aus der *Saccharomyces* Genome Database (SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002) oder manuellen Annotationen (nach Merz & Westermann, 2009).

Für die mitochondriale Synthese spezifischer Proteine benötigte Gene

In zehn Deletionsmutanten wurden partielle Veränderungen im mitochondrialen Translationsmuster – die Reduktion oder das Fehlen einzelner Proteinbanden – detektiert (Tab. 3-3 und Abb. 3-7). Ihnen fehlen also Komponenten, die für die Expression bzw. Reifung spezifischer, mitochondrial synthetisierter Proteine benötigt werden. Für sechs der zehn Proteine war eine solche Funktion bereits beschrieben: Aep2 (Ackermann *et al.*, 1991), Cbs2 (Rödel, 1986), Mrs1 (Kreike *et al.*, 1986), Mss51 (Perez-Martinez *et al.*, 2003), Pet54 (Costanzo *et al.*, 1989; Valencik *et al.*, 1989) und Pet494 (Costanzo & Fox, 1986). Neu mit der mitochondrialen Proteinexpression in Verbindung gebracht wurden hingegen Coq3, Cyc3, Rrg10 und Vma8.

Tabelle 3-3. Für die Expression bestimmter mitochondrialer Expressionsprodukte benötigte Gene.

Systematischer Name	Standardname	Zelluläre Funktion des Genprodukts
Kodierend für Proteine mit bekannter Beteiligung an der mtProteinexpression		
<i>YDR197c</i>	<i>CBS2</i>	mitochondrialer Translationsaktivator der <i>COB</i> mRNA
<i>YGR222w</i>	<i>PET54</i>	bindet die 5' UTR der <i>COX3</i> mRNA, um ihre Translation zu aktivieren; bindet zudem an <i>COX1</i> Gruppe I Intron A15 beta, um Splicing zu vermitteln
<i>YIR021w</i>	<i>MRS1</i>	benötigt für Splicing von zwei mitochondrialen Gruppe I Introns
<i>YLR203c</i>	<i>MSS51</i>	benötigt für Translation von <i>COX1</i> mRNA
<i>YMR282c</i>	<i>AEP2</i>	evtl. beteiligt an Translation der mitochondrialen <i>ATP9</i> mRNA
<i>YNR045w</i>	<i>PET494</i>	mitochondrialer Translationsaktivator spezifisch für die <i>COX3</i> mRNA
Kodierend für Proteine, für die bisher keine Beteiligung an der mtTranslation bekannt war		
<i>YAL039c</i>	<i>CYC3</i>	Cytochrom c Häm-Lyase
<i>YEL051w</i>	<i>VMA8</i>	Untereinheit D der vakuolären H ⁺ -ATPase (V-ATPase)
<i>YJL062w-a</i>	<i>RRG10</i>	Protein unbekannter Funktion
<i>YOL096c</i>	<i>COQ3</i>	Komponente des mitochondrialen Ubiquinon-Synthese Komplexes

Die Auflistung enthält systematische und Standardnamen von Genen. Angaben zu zellulären Funktionen der Genprodukte stammen aus der *Saccharomyces* Genome Database (SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002) oder manuellen Annotationen (nach Merz & Westermann, 2009).

Coq3 wird für die Ubiquinon-Biosynthese (Coenzym Q) in den Mitochondrien benötigt (Marbois *et al.*, 2005). Hier wurde zusätzlich gezeigt, dass die entsprechende Gendelektion auch eine starke Reduktion der Cox1-Menge bewirkt (Abb. 3-7 Bahn 11). Cyc3 ist die mitochondriale Cytochrom c Häm-Lyase, die im Intermembranraum den Häm-Kofaktor an Apo-Cytochrom c bindet (Dumont *et al.*, 1987). In der Deletionsmutante wurde eine starke Reduktion an Cox1 und Cytochrom b beobachtet. Darüber hinaus trat eine zusätzliche

Proteinbande unbekannter Identität oberhalb von Cox3 auf (Abb. 3-7, Bahn 2). Cyc3 könnte also auch an der Biogenese anderer mitochondrialer Proteine beteiligt sein. Bei Rrg10 handelt es sich um ein bisher uncharakterisiertes mitochondriales Protein mit, wie unter 3.1.2.5 diskutiert wird, möglicher Rolle in der *COX1*-Expression (Abb. 3-7, Bahn 7). In der $\Delta vma8$ -Deletionsmutante, der eine Untereinheit der vakuolären H^+ -ATPase fehlt (Graham *et al.*, 1995), werden Cox1 und Atp6 nur in minimalen Mengen gebildet (Abb. 3-7, Bahn 4). Möglicherweise ist dieses Ergebnis ein Indikator dafür, dass die Expression von *COX1* und *ATP6* besonders empfindlich gegenüber Veränderungen des zellulären Metabolismus ist.

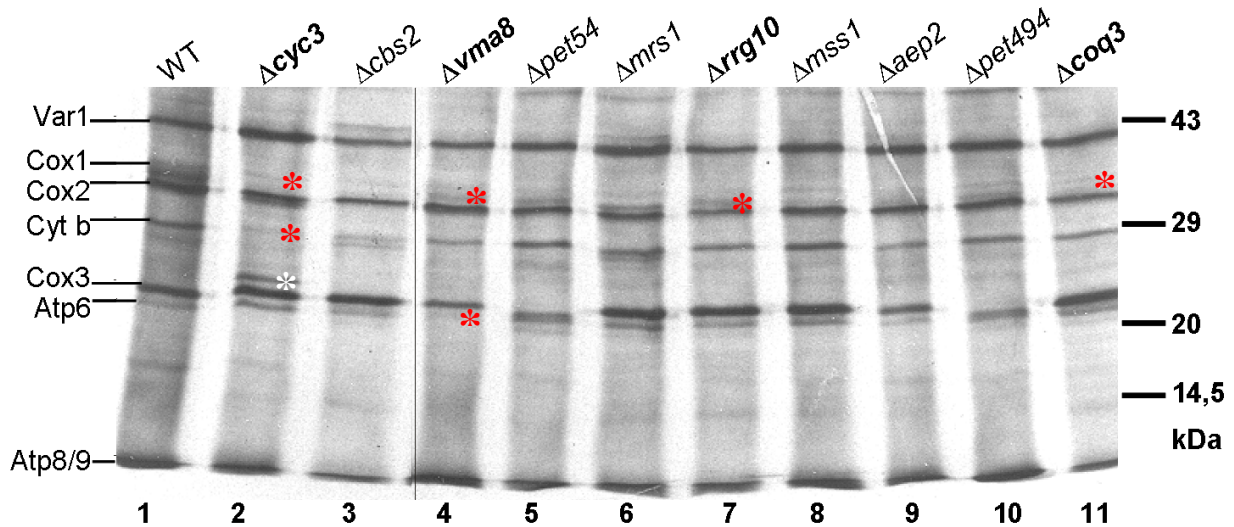


Abbildung 3-7: In zehn Deletionsmutanten wurden partiell veränderte mitochondriale Translationsmuster beobachtet. Hefezellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in raffinosehaltigem Medium angezogen und nach Cykloheximidbehandlung für 30 min bei 30°C mit [35 S]-Methionin markiert. Die erhaltenen Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulosemembran und Autoradiographie analysiert. Alle Mutanten wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten untersucht. Die hier gezeigten Daten stammen aus dem selben Experiment. Zwischen den Bahnen 3 und 4 wurde eine Bahn ausgeschnitten, was durch einen Strich gekennzeichnet ist. Im Vergleich zu wildtypischen Hefezellen, die acht Proteine (vgl. Beschriftung am linken Bildrand) mitochondrial exprimieren, fehlen in den abgebildeten Deletionsmutanten bestimmte Genprodukte vollständig oder werden in stark reduziertem Maß exprimiert. Für die fett gedruckten Mutanten wurde zum ersten Mal ein Zusammenhang mit der Synthese mitochondrialer Proteine beobachtet. In diesen Fällen sind fehlende Banden mit roten Sternchen gekennzeichnet. Im Deletionsstamm $\Delta cyc3$ kann oberhalb der Cox3-Bande eine zusätzliche Proteinbande unbekannter Identität detektiert werden (weißes Sternchen) (nach Merz & Westermann, 2009).

3.1.2.4 Andere Gene mit Bedeutung für die Respiration

Neben den bereits diskutierten Deletionsstämmen mit Veränderungen im Translationsmuster wurden insgesamt 61 respiratorisch inkompetente Mutanten mit wildtypischer mitochondrialer Translationsaktivität identifiziert (Tab. A5). Ihre deletierten Gene sind vermutlich weder für den mtDNA-Erhalt noch für die mitochondriale Proteinsynthese

essentiell. Diese Gruppe beinhaltet 32 Gene, die für bekannte mitochondriale Proteine kodieren. Der Großteil davon wird für die Assemblierung der Atmungskette benötigt. 18 Gene kodieren bekannte extra-mitochondriale Proteine, wobei die Hälfte in Verbindung zur Vakuolenfunktion steht (Tab. A5). Darüber hinaus sind erstaunlich viele Mutationen von Genen, die für V-ATPase Untereinheiten kodieren, hoch penetrant (Abb. 3-2 B und Tab. A2). Deshalb ergibt sich die Frage, wie die Funktion der Vakuolen mit der respiratorischen Kompetenz zusammenhängt. Drei Erklärungsansätze sind dabei denkbar. Zunächst stellt die Vakuole einen Speicher für Metabolite dar und sorgt für cytosolische Ionen- und pH-Homöostase (Klionsky *et al.*, 1990; Kane, 2006). Bei Fehlfunktionen in diesen wichtigen Prozessen könnte es zur Störung des mitochondrialen Metabolismus kommen. Darüber hinaus macht der Verlust der V-ATPase-Aktivität die Zellen hypersensitiv gegenüber oxidativem Stress (Thorpe *et al.*, 2004; Kane, 2007; Milgrom *et al.*, 2007). Diese Empfindlichkeit könnte sich ebenfalls negativ auf die mitochondriale Funktion auswirken. Als dritte Erklärung kann die Funktion der Vakuole als terminales Kompartiment des Autophagiestoffwechsels angeführt werden. Da in Hefe auch Mitochondrien durch Autophagie abgebaut werden (Kissova *et al.*, 2007), ist es möglich, dass die Vakuole eine entscheidende Rolle in der mitochondrialen Qualitätskontrolle und im mitochondrialen *turnover* einnimmt. Die hohe Anzahl an *pet*-Mutanten, denen die V-ATPase fehlt, deckt eine wichtige, bisher noch nicht voll verstandene funktionelle Beziehung zwischen Vakuolen und Mitochondrien auf.

Einen Translations- und primär mtDNA-unabhängigen *pet*-Phänotyp entwickelten außerdem elf Deletionsmutanten uncharakterisierter ORFs. Fünf dieser ORFs überlappen mit bekannten proteinkodierenden Genen (vier sind ebenfalls in dieser Gruppe enthalten; die fünfte Gendeletion zeigte keinen *pet*-Phänotyp) und sind deshalb wahrscheinlich nicht kodierend. Die verbleibenden sechs (*YDL129w*, *YDL133w*, *YDL033w/RRG4*, *YNL213c/RRG9*, *YOL071w* und *YOL083w*) hingegen kodieren vermutlich neue Proteine mit Beteiligung am Erhalt der respiratorischen Aktivität. Mögliche Funktionen von Rrg4 und Rrg9 werden im Folgenden diskutiert.

3.1.2.5 Neue Komponenten, die essentiell für die respiratorische Kompetenz sind

Die durchgeführten Untersuchungen bringen alle im Rahmen dieser Arbeit erfassten, bisher uncharakterisierten *RRG*-Gene klar mit der mitochondrialen Funktion in Beziehung. Die funktionellen Eigenschaften der entsprechenden Deletionsmutanten sind in Tab. 3-4 zusammengefasst. Auch publizierte Lokalisationsstudien deuten auf eine mitochondriale Rolle hin. Die Proteine Rrg1, Rrg2 und Rrg5 bis Rrg10 wurden in Hochdurchsatzstudien

mittels GFP-Fusion (Huh *et al.*, 2003) und/oder mitochondrialen Proteomanalysen (Sickmann *et al.*, 2003; Reinders *et al.*, 2006) als mitochondrial lokalisiert. Rrg3 trägt laut Vorhersage des MITOPROT Programms (Claros & Vincens, 1996) mit hoher Wahrscheinlichkeit (0,9484) eine mitochondriale Präsequenz. Lediglich die intrazelluläre Lokalisation von Rrg4 ist unklar, da ein Rrg4-GFP-Fusionsprotein nicht innerhalb der Zelle visualisiert werden kann (Huh *et al.*, 2003).

Table 3-4. Funktionelle Eigenschaften der neu beschriebenen *RRG*-Deletionsmutanten.

Standard Name	Systematischer Name	mitochondriale Lokalisation	Kreuzung mit $\Delta mip1$	Cytoduktion	mtDNA nach der Cytoduktion	mtTranslationsaktivität nach der Cytoduktion
<i>RRG1</i>	<i>YDR065w</i>	(4)	-	-	verändert	fehlt
<i>RRG2</i>	<i>YGR150c</i>	(4),(2)	-	-	verändert	fehlt
<i>RRG3</i>	<i>YJL046w</i>	(1)	+	-	wt	wt
<i>RRG4</i> (<i>IRC19</i>)	<i>YLL033w</i>	unbekannt	-	-	wt	wt
<i>RRG5</i>	<i>YLR091w</i>	(3),(4),(2)	-	-	fehlt	fehlt
<i>RRG6</i> (<i>HER2</i>)	<i>YMR293c</i>	(3),(4),(2)	-	-	verändert	fehlt
<i>RRG7</i>	<i>YOR305w</i>	(2)	+	+	o.A.	o.A.
<i>RRG8</i>	<i>YPR116w</i>	(2)	-	-	verändert	fehlt
<i>RRG9</i>	<i>YNL213c</i>	(4)	-	-	verändert	wt
<i>RRG10</i>	<i>YJL062w-a</i>	(4),(2)	+	-	wt	verändert

Aufgeführt sind systematische und Standardnamen der *RRG*-Gene und Referenzen zur mitochondrialen Lokalisation der Genprodukte. Dabei bedeutet (1) Claros & Vincens, 1996, (2) Huh *et al.*, 2003, (3) Sickmann *et al.*, 2003 und (4) Reinders *et al.*, 2006. + beschreibt Rettung durch Paarung mit $\Delta mip1$ oder Cytoduktion. Als wt werden wildtypähnliche mitochondriale mtDNA-Nukleotide nach der Cytoduktion bezeichnet. o.A. steht für ohne Angabe (nach Merz & Westermann, 2009).

Die Deletionsmutanten $\Delta rrg1$, $\Delta rrg2$, $\Delta rrg4$, $\Delta rrg5$, $\Delta rrg6$, $\Delta rrg8$ und $\Delta rrg9$ gehören der Klasse I an und besitzen dementsprechend kein intaktes mitochondriales Genom. DAPI-Färbungen zeigten Defekte in der Organisation der mtDNA, die auch kurze Zeit nach Einbringen von wildtypischer mtDNA durch Cytoduktion in $\Delta rrg1$, $\Delta rrg2$, $\Delta rrg6$, $\Delta rrg8$ und $\Delta rrg9$ -Zellen sichtbar waren. Die in reduzierter Anzahl vorliegenden Nukleotide waren größer als im Wildtyp, und einige Zellen hatten komplett ihre mtDNA verloren (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen legen nahe, dass Rrg1, Rrg2, Rrg6, Rrg8 und Rrg9 eine Rolle für den Erhalt der mtDNA spielen. Sofortiger und kompletter Verlust der mtDNA nach Cytoduktion in der $\Delta rrg5$ -Mutante lässt darüber hinaus auf eine essentielle Funktion von Rrg5 in diesem Prozess schließen (vgl. 3.1.2.2).

Das Protein Rrg2 besitzt ein Pentatricopeptid-Motiv (PPR-Motiv). Proteine, die ein solches Motiv tragen, sind zumeist in Plastiden und Mitochondrien lokalisiert, wo sie an verschiedenen Punkten der Genexpressionskontrolle beteiligt sind (Andrés *et al.*, 2007). Ein Fehlen mitochondrialer Translationsaktivität und ein früher Verlust der mtDNA, wie sie hier beobachtet wurden, stimmen mit einer Rolle von Rrg2 in der Kontrolle der mitochondrialen Genexpression überein.

$\Delta rrg3$ ist eine Klasse III *pet*-Mutante, die ein mitochondriales [*rho*⁺]-Genom aufrecht erhalten und vollständige mitochondriale Proteinsynthese betreiben kann. Rrg3 weist eine hohe Homologie zu Mitgliedern der Lipoat-Proteinligase Familie (Morris *et al.*, 1994) auf. Deshalb ist denkbar, dass dieses Protein die Anbindung von Liponsäure-Kofaktoren an mitochondriale Multienzymkomplexe wie die Pyruvat-Dehydrogenase, die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase, die Glycin-Decarboxylase oder andere vermittelt. Zudem ist die Lipoat-Proteinligaseaktivität wichtig für die Reifung des mitochondrialen tRNA-prozessierenden Enzyms RNase P (Schonauer *et al.*, 2008). Es wäre interessant zu untersuchen, ob Rrg3 in diesem Prozess eine spezifische Rolle spielt.

Die Mutante $\Delta rrg4$ wurde kürzlich als eine von 86 Deletionsmutanten identifiziert, die eine erhöhte Assemblierung von Rad52 aufweisen. Dieses Protein ist eine Schlüsselkomponente der nukleären DNA-Reparatur über homologe Rekombination, weshalb das *RRG4*-Gen als *IRC19* (*increased recombination centers*) bezeichnet wurde (Alvaro *et al.*, 2007). Alvaro *et al.* (2007) identifizierten auch andere Gene mit Bezug zur mitochondrialen Funktion (u. a. *CBT1*, *COX16*, *MRP17*, *MRPL1*, *MRPS16* und *YMR31*) und schlugen vor, dass eine erhöhte oxidative Schädigung aufgrund beeinträchtigter Atmungskettenfunktion spontane DNA-Läsionen im Kern stimulieren könnte. Dadurch bestünde eine funktionelle Verbindung zwischen mitochondrialer Atmung und DNA-Reparaturprozessen im Kern.

Aktuelle Ergebnisse stellen eine genetische Beziehung zwischen *RRG5* und den Prohibitinen her (Osman *et al.*, 2009). Die Prohibitine Phb1 und Phb2 sind zwei homologe Proteine, die in multimeren, hochmolekularen ringförmigen Komplexen in der mitochondrialen Innenmembran vorliegen und regulatorische Funktionen im Rahmen der Zellproliferation sowie der Dynamik und Funktion von Mitochondrien einnehmen. Darüber hinaus wurde in der entsprechenden Deletionsmutante $\Delta ylr091w$ eine veränderte Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Membranen beobachtet, wobei insbesondere der Anteil an Cardiolipin (CL) und Phosphatidylethanolamin (PE) reduziert war (Osman *et al.*, 2009). Beides sind Phospholipide mit großer Bedeutung für die mitochondriale Struktur und Integrität (Osman *et al.*, 2009). Eine veränderte Lipidzusammensetzung kann sowohl die

Stabilität der Atmungskettensuperkomplexe (Pfeiffer *et al.*, 2003) als auch die Prozessierung der Fusionskomponente Mgm1 und damit die mitochondriale Fusion beeinträchtigen (Osman *et al.*, 2009). Beides – vollständige Assemblierung der ATP-Synthase und mitochondriale Fusion – sind Prozesse, die für eine Aufrechterhaltung der mtDNA benötigt werden (Paul *et al.*, 1989; Westermann, 2008). Möglicherweise handelt es sich also bei Rrg5 um eine Komponente des mitochondrialen Lipidstoffwechsels, die dadurch eine entscheidende Funktion für den Erhalt der mitochondrialen DNA einnimmt.

Das *RRG6*-Gen wurde kürzlich in einem Screen nach Komponenten mit Beteiligung an der ER-Formgebung identifiziert und *HER2* (*Hmg2-induced ER remodelling*) genannt. Seine Rolle und molekulare Funktion in diesem Prozess ist bisher unbekannt (Federovitch *et al.*, 2008). Da Rrg6 sowohl in GFP-Fusionsstudien als auch Proteomanalysen mitochondrial lokalisiert wurde (Huh *et al.*, 2003; Sickmann *et al.*, 2003; Reinders *et al.*, 2006), ist es wahrscheinlicher, dass seine primäre Funktion in Beziehung zum Erhalt der respiratorischen Kompetenz steht. Das Protein zeigt hohe Homologien zur bakteriellen Glutamyl-tRNA-Amidotransferase und eine Rolle in der mitochondrialen Proteinsynthese stimmt mit der Beobachtung überein, dass die mitochondriale Translation blockiert ist (Tab. 3-2).

Δrrg7 ist eine Klasse II-Mutante, die ihre respiratorische Inkompetenz vermutlich unabhängig vom Genotyp erwirbt. Das *RRG7*-Gen kodiert für ein mitochondriales Protein (Huh *et al.*, 2003), das Homologe in Pilzen und anderen niedrigen Eukaryoten besitzt. Seine Funktion in der mitochondrialen Biosynthese ist gegenwärtig unklar.

Bei *Δrrg10* handelt es sich um eine Klasse III *pet*-Mutante, die in der Lage ist, ihr mitochondriales [*rho*⁺]-Genom aufrecht zu erhalten. Das *RRG10*-Gen kodiert für ein kleines Protein von nur 85 Aminosäuren. Die Analyse des mitochondrialen Translationsmusters zeigte eine Reduktion von Cox1, was vermuten lässt, dass Rrg10 eine spezifische Rolle in der Transkription oder Reifung der mitochondrialen mRNA und/oder der Translation oder Assemblierung dieses mitochondrialen Genprodukts spielt.

3.1.2.6 Der Einfluss extragenomischer Faktoren

Die respiratorische Inkompetenz von 23 *pet*-Mutanten wurde sowohl durch Kreuzung mit *Δmip1* als auch durch Cytoduktion gerettet (Klasse II; Tab. A3). Diese Mutanten besitzen ein mitochondriales [*rho*⁺]-Genom, was durch die Kreuzung mit *Δmip1* gezeigt wurde, und können nach Erhalt von frischem cytosolischem Material durch Cytoduktion auch ohne genbasierte Deletionskomplementation – zumindest für einige Generationen – wieder Atmung betreiben. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass die respiratorische Kompetenz

nicht ausschließlich vom mitochondrialen oder vom Kerngenom abhängt, sondern möglicherweise zusätzlich von extragenomischen Faktoren bestimmt wird. Dazu sind grundsätzlich zwei verschiedene Wirkmechanismen denkbar. Zum einen kann der Ausgleich der Deletion während der Cytoduktion auf Proteinebene erfolgen. Während der unvollständigen Paarung bildet sich ein gemischtes Cytoplasma, in dem durch den Donor wildtypische Konzentrationen aller Proteine vorliegen. Diese können entweder frei, gebunden in prä-assemblierten Komplexen oder in intakten Organellen übertragen werden. Den entstehenden Zellen und Nachkommen steht damit – solange bis die Proteine abgebaut und/oder durch Zellteilung ausgedünnt werden – ein wildtypischer Proteinpool zur Verfügung. Die Rettung im Cytoduktionsexperiment wäre demnach ein transienter Zustand, der durch die Geschwindigkeit des Proteinabbaus limitiert wird. Im zweiten Fall hängt die respiratorische Kompetenz nicht (nur) vom Proteinmangel ab, sondern möglicherweise von erworbenen Eigenschaften der Zellen, wie sekundäre Schädigung von Biomolekülen. Hierbei leistet die Cytoduktion nicht (nur) die Kompensation des Proteinmangels, sondern auch das unerlässliche Auffrischen der gesamten Zellbestandteile. In diesem Fall wäre die Rettung zwar auch transient, aber evtl. stabiler als bei Ausgleich eines Proteinmangels, da die Akkumulation von Schäden vermutlich langsamer voranschreitet als der Proteinabbau.

In zehn der Klasse II-Mutanten fehlen bekannte mitochondriale Proteine ($\Delta coq5$, $\Delta coq10$, $\Delta cox10$, $\Delta cox16$, $\Delta cox19$, $\Delta mct1$, $\Delta mss2$, $\Delta nfu1$, $\Delta slm3$, and $\Delta som1$). Darunter sind vier Assemblierungsfaktoren der Cytochrom *c* Oxidase (COX-Komplex). Cox10 ist für die Synthese des Häm A-Kofaktors erforderlich (Nobrega *et al.*, 1990; Tzagoloff *et al.*, 1993), Cox19 ist ein Metallochaperon, das Kupfer auf den COX-Komplex überträgt (Nobrega *et al.*, 2002), Mss2 wird für die Membrantranslokation des C-Terminus des mitochondrial kodierten Cox2-Proteins benötigt (Broadley *et al.*, 2001), und Cox16 trägt auf bisher unbekannte Weise zur Assemblierung des COX-Komplexes bei (Carlson *et al.*, 2003). Alle vier Proteine werden für die Assemblierung des COX-Komplexes auf post-translationaler Ebene benötigt. Wo in vorangegangenen Arbeiten ausschließlich der respiratorische Defekt der $\Delta cox10$, $\Delta cox16$, $\Delta cox19$, and $\Delta mss2$ Mutanten erfasst wurde (Nobrega *et al.*, 1990; Broadley *et al.*, 2001; Nobrega *et al.*, 2002; Carlson *et al.*, 2003), liefert die vorliegende Arbeit darüber hinaus einen Hinweis darauf, dass auch extragenomische Faktoren eine Rolle für den Verlust der respiratorischen Kompetenz spielen könnten. Deshalb wurden diese Deletionsmutanten (COX-Assemblierungs-Mutanten) im Folgenden weiter untersucht.

3.1.3 Funktionelle Untersuchung der COX-Assemblierungs-Mutanten

3.1.3.1 Plasmidale Komplementation der Gendelektionen

Die COX-Assemblierungs-Mutanten konnten sowohl nach Cytoduktion, als auch durch Kreuzung mit $\Delta mip1$ wieder Atmung betreiben. Nachdem beide Experimente auf Paarung von Zellen basieren, liegt es nahe, dass extragenomische Bestandteile den Schlüssel der Rettung darstellen. Deshalb sollte zunächst getestet werden, ob im Fall der COX-Assemblierungs-Mutanten eine Übertragung frischer Zellbestandteile während der Cytoduktion bzw. $\Delta mip1$ -Kreuzung obligat für die Rettung ist. Hierzu wurden Transformationsexperimente durchgeführt. Die genomischen Deletionen der Mutanten wurden mit Plasmiden ausgeglichen, die Wildtypkopien der entsprechenden Gene unter dem endogenen Promotor kodieren. Prinzipiell erfolgt hierbei wie in der Kreuzung mit $\Delta mip1$ -Zellen eine Komplementation. Im Gegensatz zur Kreuzung aber, wo auch intakte zelluläre Komponenten vom Kreuzungspartner zur Verfügung gestellt werden, kommt es im Zuge der Transformationen tatsächlich nur zu einem Ausgleich des Proteinmangels. Die Vorgehensweise deckt also irreversible vom Proteinlevel unabhängige Schäden auf.

In drei unabhängigen Experimenten wurde das Wachstum von jeweils mindestens 100 transformanten Klonen pro Deletionsmutante auf YPG analysiert. Trotz Anzucht auf plasmiderhaltendem Selektivmedium blieb eine deutliche Anzahl an Transformanten (9-30%) auch nach der Komplementation mit dem entsprechenden Wildtypgen respiratorisch defizient (Abb. 3-8). Das Auftreten respiratorisch inkompetenter Klone wurde nicht durch die Transformationsprozedur an sich hervorgerufen, weil Transformationen von Wildtypzellen mit den gleichen Plasmiden 100% respiratorisch kompetente Klone hervorbrachten. Um zu testen, ob $\Delta cox10$, $\Delta cox16$, $\Delta cox19$ und $\Delta mss2$ Klone ihre für die respiratorische Kompetenz benötigten Eigenschaften im Laufe der Zeit verlieren, wurden die Mutanten chronologischer Alterung unterzogen (Kaeberlein *et al.*, 2007). Dafür wurden die Zellen auf glukosehaltigen Platten für mehrere Tage bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie mit komplementierenden Plasmiden transformiert wurden. Unter diesen Bedingungen war der Anteil an Klonen, die nicht gerettet werden konnten, auf 60-81% erhöht, wohingegen nur 6% gealterter Wildtypzellen nach der Transformation respiratorisch inkompetent waren (Abb. 3-8).

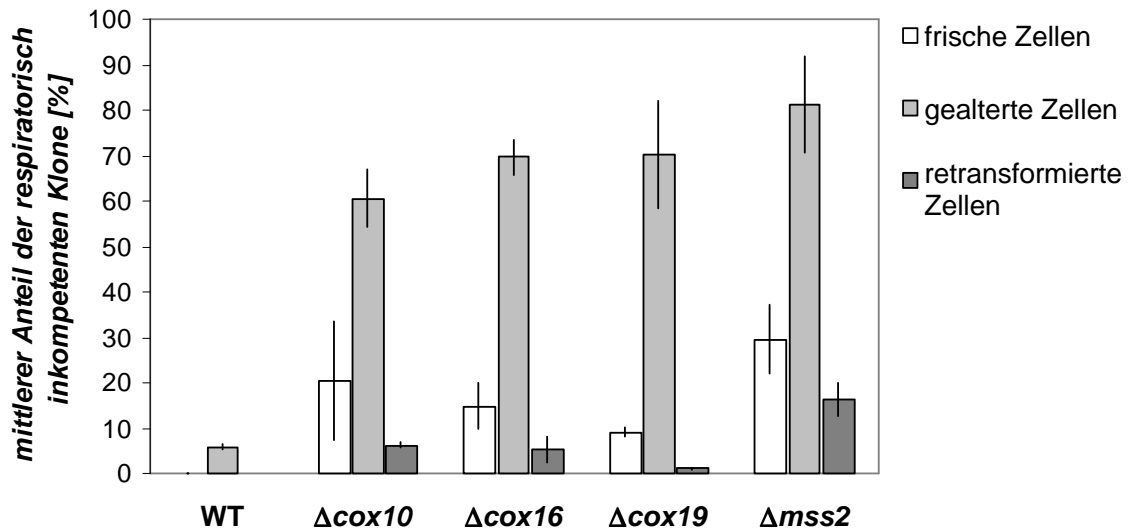


Abbildung 3-8: Plasmidale Komplementation der Gendelektionen. Δcox10 , Δcox16 , Δcox19 und Δmss2 -Zellen aus der $\text{MAT}\alpha$ -Deletionsbibliothek wurden mit Plasmiden transformiert, die das jeweils komplementierende Wildtypallel unter Kontrolle des endogenen Promotors tragen. Wildtypzellen wurden mit leeren Plasmiden transformiert. Frische Zellen wurden über Nacht bei 30°C auf YPD-Medium gezogen (weiß). Gealterte Zellen wurden 14-28 Tage bei Raumtemperatur auf YPD-Platten inkubiert, bevor sie auf frische Medienplatten übertragen und nach einer 24h-Inkubation bei 30°C mit den komplementierenden Plasmiden transformiert wurden (hellgrau). Für die Re-Transformation wurden respiratorisch kompetente Klone aus der Transformation frischer Zellen 24 h in flüssigem YPD-Medium kultiviert, auf YPD-Medienplatten ausgebracht und Einzelkolonien auf frische YPD-Platten überführt. Vor erneuter Transformation (dunkelgrau) mit den komplementierenden Plasmiden wurde durch Überstempeln auf geeignete Selektivmediumplatten der Plasmidverlust und durch parallele Δmip1 -Kreuzung die Unversehrtheit der mtDNA überprüft. Der Anteil an respiratorisch inkompetenten Zellen beträgt im Fall von frischen und retransformierten Wildtypzellen 0% und ist deshalb in der Grafik nicht sichtbar. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei unabhängigen Experimenten. Die Transformationsexperimente zeigen eine Akkumulation irreversibler Schäden, die bereits in logarithmisch wachsenden Zellen eintritt und durch Alterung beschleunigt wird.

Ein Erwerb des respiratorischen Defekts sollte in Re-Transformationsexperimenten weiter nachvollzogen werden. Hierfür wurden nach der ersten Transformation respiratorisch kompetente Klone nach Plasmidverlust erneut mit dem jeweils komplementierenden Plasmid re-transformiert. Für den Plasmidverlust wurden respiratorisch kompetente Klone aus der ersten Transformation frischer Zellen 24 h in flüssigem YPD-Medium kultiviert, auf YPD-Medienplatten ausgebracht, und Einzelkolonien auf frische YPD-Platten überführt. Durch Überstempelung auf geeignete Selektivmediumplatten wurde der Plasmidverlust und durch parallele Δmip1 -Kreuzung die Unversehrtheit der mtDNA überprüft. Im Gegensatz zu den chronologisch gealterten Zellen des vorangehenden Experiments befanden sich diese Zellen stets in der logarithmischen Wachstumsphase. Zudem waren die hier verwendeten Klone – wie durch die erfolgte Rettung im primären Transformationsexperiment und den zusätzliche Δmip1 -Kreuzungen bestätigt (Daten nicht gezeigt) – ursprünglich mit allen Voraussetzungen für eine respiratorische Kompetenz (inklusive intakter mtDNA) ausgestattet. Nach der

zweiten Transformation konnten jedoch erneut respiratorisch inkompetente Klone identifiziert werden (5-16%). Innerhalb des kurzen Zeitfensters zwischen Plasmidverlust und Re-Transformation kam es also wieder zu einer irreversiblen Schädigung. Die Re-Transformationsexperimente belegen einen spontanen Erwerb respiratorischer Inkompetenz in logarithmisch wachsenden Zellen. Einzig im Fall der Δcox19 -Mutante konnte mit einem Anteil von 1,1% an respiratorisch inkompetenten Zellen keine nennenswerte Verschlechterung festgestellt werden. Zusammen mit den ebenfalls vergleichsweise niedrigen Startwerten transformierter frischer Zellen aus der ersten Transformation und der Existenz respiratorisch kompetenter Δcox19 -Zellen in der MATa-Bibliothek (Luban *et al.*, 2005) deutet dieses Ergebnis auf ein deutlich langsames Voranschreiten der Schädigung in logarithmisch wachsenden Δcox19 -Zellen hin.

Insgesamt zeigen alle vorgenommenen Transformationsexperimente, dass die Mitochondrien in Δcox10 , Δcox16 , Δcox19 und Δmss2 -Zellen mit der Zeit irreversibel geschädigt werden, was eine respiratorische Inkompetenz hervorruft, die nicht mehr ausgeglichen werden kann. Diese Schädigung wird schon während des logarithmischen Wachstums induziert und während chronologischer Alterung stark beschleunigt. In den untersuchten COX-Stämmen (und möglicherweise auch in anderen Klasse II-Mutanten) wird der respiratorische Defekt also zusätzlich durch erworbene Faktoren begünstigt.

Um nachzuvollziehen auf welcher Ebene die Schädigung der Zellen erfolgt (mtDNA oder andere Makromoleküle), wurden Kreuzungen von respiratorisch inkompetenten Transformanten nach der Starttransformation mit Δmip1 -Zellen durchgeführt, die aufgrund ihrer Deletion [*rho*⁰] sind (Foury, 1989). Dadurch wurden alle Zellbestandteile außer der mtDNA erneuert. Das Wachstum der erzeugten Diploiden auf YPG-Medienplatten wurde erfasst. Ein Großteil davon war nicht in der Lage respiratorisch zu wachsen, was zeigt, dass die parentalen, respiratorisch inkompetenten Transformanten keine intakte mtDNA besaßen. Die mtDNA scheint also das primäre Angriffsziel der schädigenden Einflüsse zu sein. Das Ausgangspostulat, dass die respiratorische Kompetenz in Klasse II-Mutanten nicht vom mitochondrialen Genom abhängt, sollte deshalb mit nicht ursprünglich eingeschränkt werden. Allerdings beweist die sporadische Detektion (1%) von respiratorisch kompetenten Klonen nach der Δmip1 -Kreuzung (Abb. 3-9), dass die Schäden nicht ausschließlich auf die mtDNA beschränkt sind, sondern auch andere, in der Kreuzung ersetzbare Makromoleküle, wie z. B. Lipide oder Proteine, betreffen können.

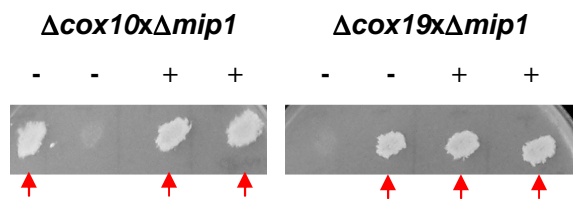


Abbildung 3-9: Überprüfung der mtDNA durch Kreuzung mit $\Delta mip1$. Nach der Starttransformation wurden respiratorisch kompetente (+) und inkompetente (-) Klone mit $\Delta mip1$ -Zellen gekreuzt und das Wachstum der entstandenen Diploiden auf YPG-Medium erfasst. Alle getesteten (+) Klone und je ein (-) Klon enthielten mtDNA (roter Pfeil).

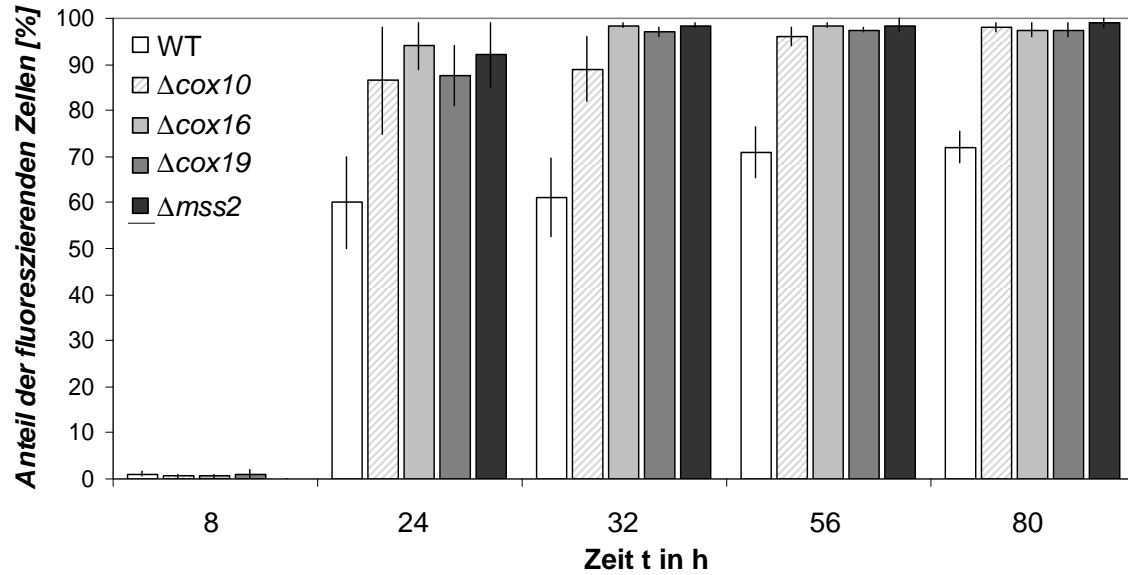
3.1.3.2 Der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Was aber sind die Faktoren, die die Akkumulation von Schäden hervorrufen? Eine häufige Ursache gravierender zellulärer Schädigung sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie Superoxidradikalanion ($O_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal (HO^{\bullet}), die unvermeidlich als Nebenprodukte der oxidativen Phosphorylierung entstehen (Meissner, 2007). Die Hauptproduzenten von ROS in Hefezellen sind dabei die rotenoninsensitiven NADH-Dehydrogenasen, die als Alternative zum klassischen NADH-Dehydrogenase-Komplex vorliegen, und der Cytochrom *bc1*-Komplex (Herrero *et al.*, 2008) (vgl. Abb. 1-1). Übersteigt die Produktionsrate die natürliche Entgiftungskapazität, kommt es zur verstärkten oxidativen Schädigung von Makromolekülen (Semenza, 2007; Hoyer *et al.*, 2008). Verschiedene Hinweise deuten darauf hin, dass auch in den Deletionsstämmen $\Delta cox10$, $\Delta cox16$, $\Delta cox19$ und $\Delta mss2$ ROS eine Rolle spielen könnten. Zum einen scheint speziell die mtDNA von den Schädigungen betroffen zu sein. Aufgrund ihrer räumlichen Nähe zur Atmungskette und der ungeschützten histonfreien Struktur ist sie oft primäres Ziel von ROS (Balaban *et al.*, 2005). Zum anderen erfolgt in $\Delta cox16$ -Zellen eine vermehrte Assemblierung von DNA-Reparaturkomplexen im Zellkern, die vermutlich durch eine erhöhte oxidative Schädigung induziert wird (Alvaro *et al.*, 2007). Darüber hinaus konnten Barros *et al.* (2003) bereits in $\Delta cox10$ - sowie $\Delta cox11$ - und $\Delta cox15$ -Deletionsmutanten, denen ebenfalls COX-Assemblierungsfaktoren fehlen, eine erhöhte ROS-Produktion nachweisen. Die zelluläre ROS-Akkumulation in den $\Delta cox10$, $\Delta cox16$, $\Delta cox19$ und $\Delta mss2$ -Mutanten sollte deshalb mittels DHR-Färbung (Dihydrorhodamin-123) untersucht werden. DHR ist ein nicht-fluoreszierender, membrandiffusibler Farbstoff, der durch ROS zu grün fluoreszierendem, nicht-diffusiblem Rhodamin-123 oxidiert wird. Die Fluoreszenz von Zellen ist damit ein direkter Indikator für die Anwesenheit von ROS.

Die Akkumulation von ROS wurde zeitabhängig verfolgt. Hierfür wurden die für die Färbungen verwendeten Kulturen zum Zeitpunkt 0 h frisch beimpft und zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots für die DHR-Behandlung entnommen. Die Probennahmen erfolgten nach 8 h in der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen und in der stationären Phase

nach 24, 32, 56 und 80 h. Der Anteil fluoreszierender Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch erfasst (Abb. 3-10 A). Diese Vorgehensweise wurde jeweils in drei unabhängigen Experimenten wiederholt.

(A)



(B)

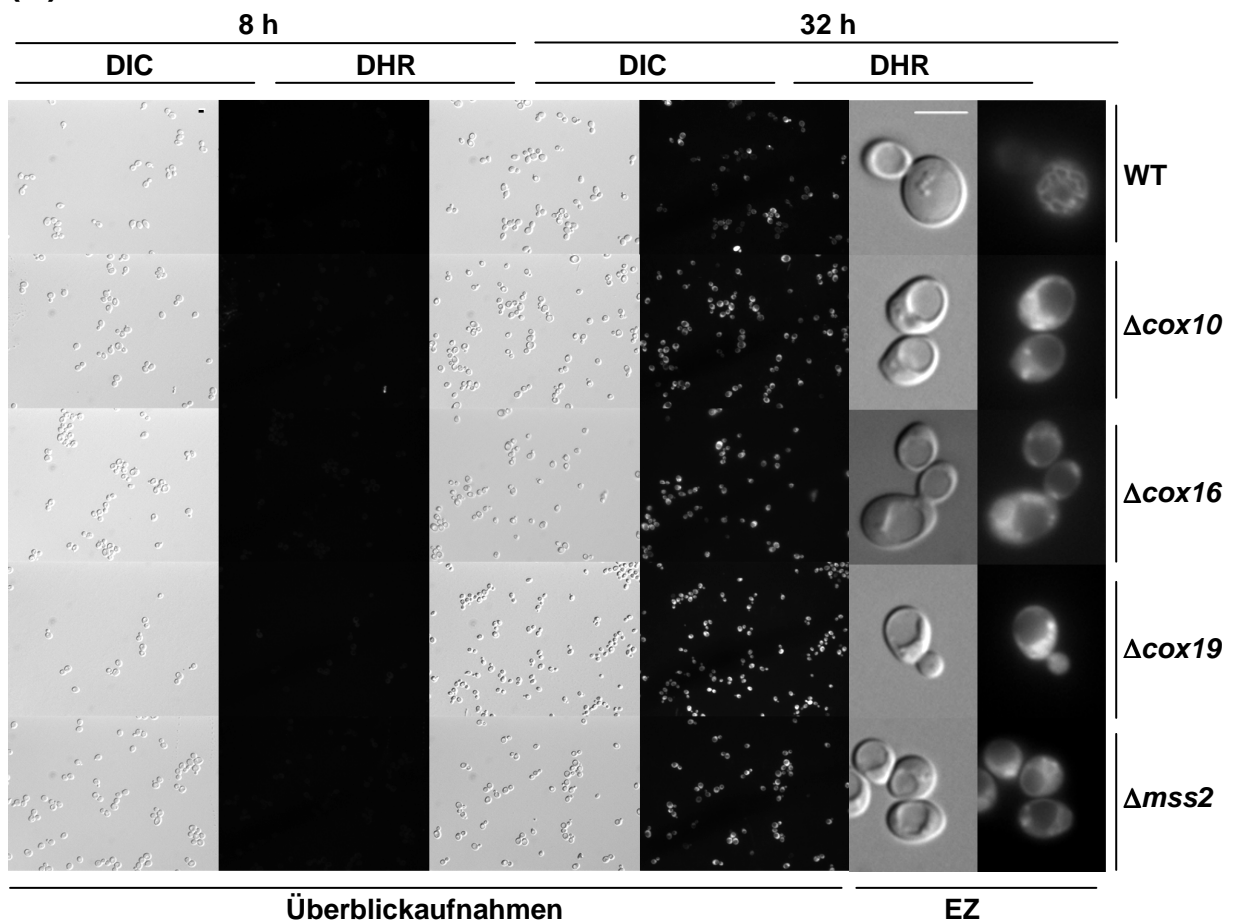


Abbildung 3-10: Stationäre COX-Assemblierungs-Mutanten akkumulieren verstärkt ROS.
Bildbeschreibung siehe S. 69.

Abbildung 3-10: Stationäre COX-Assemblierungs-Mutanten akkumulieren verstärkt ROS. Zellkulturen wurden in flüssigem YPD-Medium bei 30°C gezogen. 1 ml Aliquots wurden nach 8, 24, 32, 56 und 80 h Inkubationszeit entnommen und für fluoreszenzmikroskopische Analysen und Quantifizierungen mit DHR (Dihydrohodamin-123) gefärbt. **(A)** Zeitlicher Verlauf der ROS-Akkumulation. Aufgetragen sind Mittelwerte des Anteils an fluoreszierenden Zellen aus drei unabhängigen Experimenten (jeweils n=100) mit Standardabweichungen gegen den Zeitpunkt der Probennahme in h. Bereits mit dem Übergang der Kulturen in die stationäre Phase kommt es nach 24 h zu einem deutlichen Anstieg der ROS-produzierenden, grün fluoreszierenden Zellen, wobei deren Anteil in mutanten Kulturen (grau) etwa ein Drittel höher ist als in den Wildtypkulturen (weiß). **(B)** DHR-gefärbte COX-Deletionsmutanten weisen eine breitere und intensivere Fluoreszenz auf als parallel untersuchte Wildtypzellen. Überblicksaufnahmen wurden mit 40facher Vergrößerung und Einzelaufnahmen (EZ) mit 100facher Vergrößerung erstellt. Die Einzelaufnahmen sind im Vergleich zu den Überblicksaufnahmen vergrößert dargestellt. Jedes Bildpaar besteht aus einer Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC) und einer Fluoreszenz-Aufnahme (DHR). Die jeweils abgebildeten Größenbalken entsprechen 5 µm und gelten für alle Aufnahmen. In der logarithmischen Wachstumsphase (8 h) ist nur Autofluoreszenz vorhanden, wohingegen Zellen aus der stationären Phase (32 h) eine deutliche DHR-Fluoreszenz zeigen, die mit ROS-Akkumulation gleich zu setzen ist.

Sowohl in den Wildtyp- als auch in den mutanten Kulturen fluoreszierten nach 8 h <2% der Zellen. Bereits nach 24 h war der Anteil der fluoreszierenden Zellen auf durchschnittlich 50% in Wildtyp- und 86,5 bis 92% in den mutanten Kulturen angestiegen. Zum Zeitpunkt 56 h fluoreszierten annähernd 100% der mutanten Zellen und 71% der Wildtypzellen. Dabei war die Fluoreszenzintensität in den mutanten Zellen insgesamt stets höher als die in Wildtypzellen. Mit dem Eintritt in die stationäre Phase kam es also zu einem detektierbarem Anstieg der ROS-Produktion, der in den Deletionsstämmen deutlich verstärkt war (Abb. 3-10 A). Zusätzlich war die Fluoreszenz in den Deletionsmutanten über die gesamte Zelle verteilt, wohingegen in den Wildtypzellen beinahe eine selektive Färbung der Mitochondrien beobachtet wurde (Abb. 3-10 B). Die ROS sind in den Mutanten also nicht nur vermehrt, sondern auch zusätzlich breiter verteilt, sodass eine umfassende Schädigung der gesamten Zelle erfolgen kann.

Der Grad der Fluoreszenz in den Wildtypkulturen spiegelt die natürliche ROS-Konzentration wider, die primär durch die Atmungskette und weitere oxidative Prozesse (in z. B. den Peroxisomen und im ER) erzeugt wird. In der logarithmischen Phase (8 h) fermentieren die Hefezellen die vorliegende Glukose. Es werden nur wenige ROS gebildet, weil die zelluläre Atmung reprimiert wird und weniger Mitochondrienmasse vorliegt (Cabiscol *et al.*, 2000). Der sprunghafte Anstieg mit Übergang in die stationäre Phase kann durch physiologische Änderungen erklärt werden. In diesem Stadium kommt es zu einer Limitierung der Kohlenstoffquelle Glukose, die zu einem transienten Wachstumsarrest führt (*metabolic transition*). In diesem Stadium verringert sich zum einen zunächst der Energiebedarf (Bonawitz *et al.*, 2006), sodass weniger O₂ verbraucht wird. Der intrazelluläre O₂-Level steigt also kurzfristig, was möglicherweise die monoelektronische Reduktion von

Sauerstoff zu $O_2^{\bullet-}$ begünstigt (Trancíková *et al.*, 2004). Zum anderen entfällt die Glukoserepression und die Zellen exprimieren zur Adaption an den respiratorischen Metabolismus verstärkt Gene, die für Proteine der mitochondrialen Genexpression und der Atmungskette kodieren (Traven *et al.*, 2001). Durch respiratorische Verstoffwechslung des vorher gebildeten Ethanol werden im Folgenden verstärkt ROS gebildet. So tragen also zwei basale Prozesse zu einer natürlichen Erhöhung der ROS-Konzentration in Hefezellen bei. Durch gleichzeitige Induktion des antioxidativen Systems werden diese jedoch abgebaut und die schädigenden Einflüsse in Wildtypzellen minimiert. Die deutlich erhöhten ROS-Konzentrationen in den Mutanten weisen auf eine Störung dieses Gleichgewichts hin.

Die Befunde aus den Transformationsexperimenten (vgl. 3.1.3.1) stehen scheinbar im Widerspruch zu den Ergebnissen der DHR-Färbungen. Obwohl die Transformationsexperimente ein Fortschreiten der irreversiblen Schädigungen während des logarithmischen Wachstums demonstrieren, sind in den entsprechenden Flüssigkulturen über DHR-Färbungen keine ROS nachweisbar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die ROS-Konzentrationen in den logarithmisch wachsenden Zellen unter der Nachweisgrenze der Färbetechnik liegen. Um dies zu überprüfen, wurden sensitivere Messungen der ROS-Konzentrationen an Mitochondrien, die aus logarithmisch wachsenden Zellen isoliert worden waren, durch Sebastian Longen (Universität Kaiserslautern, Lehrstuhl für Zellbiologie) vorgenommen. Dieses Verfahren beruht darauf, dass das farblose Substrat Amplex® Red bei Anwesenheit von H_2O_2 zu hoch fluoreszentem Resorufin umgesetzt wird (Zhou *et al.*, 1997). Die Resorufin-Bildung wird fluorimetrisch verfolgt (Anregung: 544 nm; Emission: 590 nm). So kann H_2O_2 bis zu einer Untergrenze von 100 nM nachgewiesen werden (Produktinformation Invitrogen).

Exemplarische Messungen wurden für die $\Delta cox10$ -Deletionsmutante durchgeführt. Dadurch konnte im Vergleich zu Wildtypzellen eine Verdopplung der ROS-Konzentration in den mutanten Zellen festgestellt werden. Die Ergebnisse stimmen mit vorangegangenen Studien von Barros *et al.* (2003) überein und beweisen die erhöhte Produktion von ROS auch in logarithmisch wachsenden Zellen. Das analoge Verhalten von $\Delta cox16$, $\Delta cox19$ und $\Delta mss2$ in den bisher vorgenommenen Untersuchungen legt nahe, dass auch in diesen Stämmen in der logarithmischen Phase eine erhöhte ROS-Produktion erfolgt. Um dies jedoch zu bestätigen, sind exakte Messungen (Amplex® Red-Methode) unerlässlich.

3.1.3.3 Modell zur Entstehung der respiratorischen Inkompetenz in den COX-Assemblierungs-Mutanten

Anhand der durchgeführten Experimente konnten erste Hinweise auf einen zusätzlichen Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies gewonnen werden. Das Beispiel der COX-Assemblierungs-Mutanten zeigt damit, dass die Entwicklung eines *pet*-Phänotyps oft nicht eindimensional erfolgt und durch extragenomische Faktoren verstärkt werden kann. Zusammen mit den übrigen Untersuchungsergebnissen kann folgendes Modell zur Phänotypentstehung in COX-Assemblierungs-Mutanten vorgeschlagen werden: In der Startsituation (direkt nach der Cytoduktion) besitzen die Zellen ungeschädigtes Zellmaterial und intakte, assemblierte Cytochrom *c* Oxidase (COX)-Komplexe. Diese scheinen zunächst auch im Deletionshintergrund voll funktionsfähig zu sein, zumal entsprechende Zellen nach der Cytoduktion auf YPG-Platten wachsen. Die fehlenden Proteine sind also nicht für die Funktionalität bestehender Komplexe erforderlich. Durch Proteinabbau und Ausdünnung während der Zellteilung liegen nach und nach immer weniger intakte Komplexe vor und aufgrund der Deletionen können keine neuen mehr gebildet werden. Die Atmungsaktivität sinkt sukzessive und erliegt schließlich. Die primäre Konsequenz der Deletion ist also zunächst – gemäß der beschriebenen Proteinfunktionen – der COX-Assemblierungsdefekt, der letztendlich eine fehlende COX-Aktivität hervorruft.

Die Deletionen beziehungsweise die resultierende COX-Fehlfunktion scheinen sich zudem sekundär auszuwirken. So wurde eine verstärkte Bildung von ROS in den DHR-Färbungsexperimenten beobachtet (3.1.3.2 DHR-Färbungen). Dies stimmt mit der Annahme überein, dass eine unausgewogene Produktion oder Assemblierung von Atmungskettenkomplexen den *vicious cycle of oxidative stress* induziert (Bonawitz *et al.*, 2006). Die um 1/3 erhöhte ROS-Produktion in den Mutanten resultiert vermutlich direkt aus der gestörten Elektronentransportkette. Barros *et al.* (2003) konnten zeigen, dass Antimycin A³-behandelte Wildtypzellen und Cytochrom *bc1*-Komplex-Mutanten ROS akkumulieren. Künstliche Inhibition scheint also den gleichen Effekt wie intrinsische Manipulation durch Deletion auf die Atmungskette zu haben. Deshalb liegt es nahe, dass es in den hier untersuchten Mutanten bei Erliegen der COX-Aktivität – analog zu einer Cytochrom *c* Oxidase-Inhibition durch Cyanide (Sipos *et al.*, 2003) – gewissermaßen zu einem Elektronenstau kommt. Die Atmungskettenkomplexe *upstream* liegen reduziert vor und besitzen damit ein erhöhtes Reduktionspotential, wodurch die ROS-Produktion durch Übertragung einzelner Elektronen auf O₂ begünstigt wird (Johnson & DeMars, 2004). In den COX-Assemblierungs-Mutanten

³ Antimycin A: Inhibitor des Cytochrom *bc1*-Komplexes.

erfolgt also als direkte Konsequenz der COX-Fehlfunktion stete ROS-Produktion, die bereits innerhalb kurzer Zeit zu einer gravierenden Schädigung von Proteinen, Lipiden und auch mtDNA führen kann (siehe 3.1.3.1 Re-Transformationsexperimente). Dadurch kommt es zu einer zusätzlichen Beeinträchtigung der Atmungskette, die eine weitere Verstärkung der ROS-Produktion mit weiterer Schädigung bedingt. Ein sich selbstverstärkender Kreislauf wird gestartet (*vicious cycle theory*; Bandy & Davison, 1990). Die produzierten ROS-Mengen sind schließlich so groß, dass sie aus den Mitochondrien austreten und die gesamte Zelle schädigen (siehe 3.1.3.2).

Obwohl Hefe ihren Energiebedarf bei Anwesenheit von Glukose hauptsächlich über Fermentation deckt, ist auch unter diesen Bedingungen eine elektronentransportabhängige ROS-Produktion möglich. Denn trotz Glukoserepression bleibt eine Restaktivität der Atmungskette (~10%) bestehen (Rosenfeld & Beauvoit, 2003), die aufgrund des COX-Defekts ausschließlich ROS bildet. Zusätzlich erfolgt durch Glukose eine Repression vieler Komponenten des antioxidativen Systems (z. B. Superoxiddismutase, Catalase und Glutathionperoxidase; Martínez-Pastor *et al.*, 1996), was wiederum eine mitochondriale ROS-Akkumulation begünstigt. Das bedeutet, dass COX-Assemblierungs-Mutanten auch unter fermentierbaren Bedingungen permanent oxidativem Stress ausgesetzt sind.

Bei Limitierung der Kohlenstoffquelle Glukose (am Übergang in die stationäre Phase) ist dieser Prozess sogar drastisch beschleunigt. Im Prinzip greifen hier die gleichen beiden Mechanismen wie im Wildtyp (vgl. 3.1.3.2). Primäre Ursache einer vermehrten ROS-Produktion ist der Wegfall der Glukoserepression (Gancedo, 1998) mit Umstellung des Stoffwechsels auf oxidative Phosphorylierung (*diauxic shift*). Dafür werden verstärkt Proteine des respiratorischen Programms – insbesondere Atmungskettenkomplexe – gebildet, die aufgrund fehlerhafter COX in den Mutanten nur die ROS-Produktion beschleunigen. Darüber hinaus erliegt in dieser Phase der physiologischen Veränderung auch in den Mutanten der Stoffwechsel, aufgrund des niedrigeren Energiebedarfs wird weniger O₂ verbraucht und die zelluläre O₂-Konzentration steigt (vgl. 3.1.3.2). Allerdings ist dies aufgrund der respiratorischen Inkompetenz anders als in den Wildtypkulturen kein transienter Zustand, was permanent die Wahrscheinlichkeit monoelektronischer Reduktion von Sauerstoff und die Rate der ROS-Produktion zusätzlich erhöht.

Interessanterweise üben in den Mutanten bereits die in der logarithmischen Phase gebildeten geringen Mengen an ROS stark negative Effekte aus. Obwohl die ROS-Konzentrationen nur etwa doppelt so hoch sind wie im Wildtyp (vgl. 3.1.3.2; AmplexRed-Messung) scheinen die

mutanten Zellen deutlich anfälliger für ROS-bedingte Schädigungen zu sein und es entsteht ein höherer Anteil an Zellen mit irreversibler Schädigung (Transformationsexperimente). Diese Tendenz setzt sich auch in den stationären Kulturen fort. In Analogie dazu wurde für respiratorisch inkompetente $\Delta\text{cox6-}$, $[\text{rho}^0]$ - und wildtypische Antimycin A-behandelte Zellen eine stärkere Empfindlichkeit gegenüber extern zugegebenem H_2O_2 experimentell nachgewiesen (Grant *et al.*, 1997; Trancíková *et al.*, 2004). Erklärungsansätze für diese stärkere Anfälligkeit liefern Trancíková *et al.* (2004) und Grant *et al.* (1997): Sie gehen davon aus, dass die Entgiftung und Reparatur ROS-geschädigter Moleküle zahlreiche energieverbrauchende Schritte beinhaltet. Diese Energie kann jedoch aufgrund der mitochondrialen Fehlfunktion nicht ausreichend bereit gestellt werden, sodass das Ungleichgewicht zwischen ROS-Produktion und -Abbau weiter verstärkt wird. Funktionelle Mitochondrien stellen also selbst das basale Level der ROS-Resistenz dar (Grant *et al.*, 1997). Auf alle Arten des oxidativen Stress, egal ob extern oder intern entstanden, erfolgt die gleiche zelluläre Antwort. Deshalb liegt es nahe, dass dieses Modell auch auf die ROS-Produktion in den COX-Assemblierungs-Mutanten übertragbar ist. Neben der vermehrten Produktion kommt so möglicherweise auch eine beeinträchtigte Entgiftung zum tragen, die den oxidativen Stress weiter erhöht.

Ebenfalls sekundär zu den Deletionen könnte es in den COX-Assemblierungs-Mutanten auch zu einer Veränderung des Intermediärmetabolismus kommen. In Microarrayanalysen wurde für Antimycin A-behandelten Wildtyphefezellen und $[\text{rho}^0]$ -Zellen bereits gezeigt, dass aufgrund einer respiratorischen Inkompetenz eine Veränderung des Metabolismus eintritt. Dieser Prozess wird als retrograde Antwort bezeichnet, weil sich der funktionelle Zustand der Mitochondrien direkt auf nukleäre Prozesse auswirkt (Butow & Avadhani, 2004). Insbesondere Gene, die peroxisomale Proteine kodieren, wurden verstärkt exprimiert, was eine vermehrte Peroxisomenbiogenese zur Folge hatte (Epstein *et al.*, 2001). Dies stimmt mit früheren Untersuchungen überein, die als Antwort auf respiratorische Defekte eine 30-40fach erhöhte Expression der peroxisomalen Citratsynthase Cit2 zeigten (Liu & Butow, 1999). Bei einem Defekt der Atmungskette erliegt auch der Tricarbonsäurezyklus (Succinat kann nicht zu Fumarat oxidiert werden) und es fehlen Metabolite, die unter anderem für die Aminosäure- und Nukleotidbiosynthese benötigt werden (z. B. Oxalacetat, α -Ketoglutarat). Die induzierten peroxisomalen Stoffwechselwege, insbesondere Enzyme des Glyoxylat-Zyklus, sollen diesen Mangel ausgleichen (Epstein *et al.*, 2001; Butow & Avadhani, 2004). Inwieweit diese Prozesse die zelluläre ROS-Akkumulation verstärken ist unklar. Ein zusätzlicher Beitrag zur

ROS-Produktion ist jedoch unwahrscheinlich, da ansonsten alle [*rho*⁰]-Stämme erhöhte ROS-Konzentrationen aufweisen müssten, was nicht der Fall ist. Deshalb ist es wahrscheinlicher, dass das notwendige Übergewicht an metabolischer Tätigkeit in den Peroxisomen möglicherweise die peroxisomale Antwort auf die in der gesamten Zelle entstehenden ROS (Schrader & Fahimi, 2006) leicht beeinträchtigt. Bei gleichzeitig mitochondrialer ROS-Produktion, wie in den vorliegenden COX-Assemblierungs-Mutanten, könnte dies ausreichen, um wiederum das Ungleichgewicht zwischen Produktions- und Abbaurate zu verschieben.

Die primäre Ursache der beobachteten respiratorischen Inkompetenz in den vorliegenden Mutanten Δcox10 , Δcox16 , Δcox19 und Δmss2 ist die Cytochrom *c* Oxidase-Fehlfunktion, durch die der Elektronentransport gestört wird. Sekundär entstehen dadurch vermehrt ROS, deren Produktion sich selbst verstärkt. Parallel beeinträchtigt der durch den respiratorischen Defekt bestehende Energiemangel den ROS-Abbau. So kommt es zu einer verstärkten ROS-Akkumulation, die gravierende zelluläre Schädigungen hervorruft.

3.2 Studien zur mitochondrialen Morphogenese

Mitochondrien sind Schlüsselkomponenten zahlreicher physiologischer Prozesse. Deshalb beinhaltet die mitochondriale Biogenese nicht nur die Bildung und den Erhalt einer funktionellen Atmungskette, die im vorangehenden Kapitel beschrieben sind. Eine zentrale Rolle nimmt auch die mitochondriale Morphogenese ein, die eine Anpassung der Mitochondrien an die jeweiligen zellulären Gegebenheiten ermöglicht. Teilbereiche dieses Prozesses wurden im Folgenden untersucht.

3.2.1 Identifizierung von Wechselwirkungspartnern der mitochondrialen Innenmembranteilungskomponente Mdm33

Als einzige Komponente der mitochondrialen Innenmembranteilung wurde bisher Mdm33 identifiziert (Messerschmitt *et al.*, 2003). Über genetische Interaktion sollten Wechselwirkungspartner dieses Proteins gefunden werden. Die Überexpression von *MDM33* führt in Wildtyphefenzellen zu Letalität und Fragmentierung von Mitochondrien (Messerschmitt *et al.*, 2003). Wenn wichtige Interaktionspartner, z. B. durch Deletion, fehlen, sollten die Letalität und die mitochondriale Fragmentierung aufgrund einer unterbrochenen Mdm33-Wirkkaskade abgeschwächt oder verhindert werden. *MDM33* wurde deshalb in Deletionsstämmen überexprimiert. Positive Stämme wurden anhand von Lebensfähigkeit und Erhalt wildtypischer mitochondrialer Strukturen identifiziert.

Für die Durchmusterung wurde ausgehend von der ~4800 Hefestämme umfassenden *MAT α* -Deletionsbibliothek (BioCat, Heidelberg; Giaever *et al.*, 2002; Kastenmayer *et al.*, 2006) eine Auswahl an Mutanten zusammengestellt. Von Interesse waren dabei hauptsächlich Stämme, deren deletierte Gene für Proteine mit mitochondrialer Lokalisation und unbekannter Funktion kodieren. Als Grundlage für die Auswahl dienten die Ergebnisse der LCMS-basierenden mitochondrialen Proteomanalyse von Sickmann *et al.* (2003) und die Datenbanken *Saccharomyces* Genome Database (SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002) und Comprehensive Yeast Genome Database (CYGD; Güldener *et al.*, 2005). So wurden 123 Proteine mit mitochondrialer Lokalisation und unbekannter Funktion ausgewählt. Zusätzlich wurden sieben Komponenten mit unbekannter Funktion und Lokalisation, sowie 19 mitochondriale Proteine mit bekannter Funktion ausgesucht. Dabei wurden hauptsächlich Innenmembrankomponenten verwendet, die sich in räumlicher Nähe zu Mdm33 befinden sollten. Des Weiteren wurden 15 Morphologiekomponenten hinzugefügt, um die Überexpression von *MDM33* in die Prozesse der mitochondrialen Fusion, Teilung und

Tubulation einzuordnen. Insgesamt wurden 164 Stämme für die Überexpressionsanalyse ausgewählt (Tab. A7) und zusammen mit dem isogenen Wildtypstamm BY4742 untersucht.

Nach Transformation mit dem galaktoseinduzierbaren Überexpressionsplasmid pYX223-GAL-MDM33 (Messerschmitt *et al.*, 2003) bzw. dem leeren Referenzplasmid pYX223 (Novagen, Darmstadt) und dem Plasmid pVT100U-mtGFP (Westermann & Neupert, 2000) wurden sowohl das Wachstumsverhalten als auch die mitochondriale Morphologie aller Stämme auf SGal-Medium (Minimalmediumplatten mit Galaktose als Kohlenstoffquelle) untersucht.

3.2.1.1 Beurteilung des Wachstums bei Überexpression von *MDM33*

Die galaktoseinduzierte Überexpression von *MDM33* führt in Wildtypzellen zu einem Wachstumsarrest (Messerschmitt *et al.*, 2003; siehe auch Abb. 3-12 A). Ein erster Überblick über ihren Einfluss auf das Wachstumsverhalten der 164 Testkandidaten sollte durch semiquantitative Wachstumsanalysen gewonnen werden. Hierzu wurden jeweils gleichbleibende Mengen Zellmaterial strichförmig auf SGal-Platten ausgebracht und das Wachstum nach drei Tagen Inkubation in die vier Stufen +++, ++, + und --- (Abb. 3-11) eingeteilt, wobei +++ das stärkste und --- das schwächste vorkommende Wachstum beschrieb. Für jede Mutante wurden mit dem leeren und dem Überexpressionsplasmid transformierte Varianten verwendet und deren relatives Wachstum zueinander beurteilt. Dabei wurde unterschieden zwischen (1) Wachstumsverschlechterung durch Überexpression, (2) Wachstumsdefekt auf SGal bereits mit leerem Plasmid und (3) gleichbleibendem Wachstum trotz Überexpression. Als „positiv“ gewertet wurden Stämme der dritten Gruppe. Insgesamt konnten dadurch 14 Deletionsmutanten als überexpressionstolerant identifiziert werden (Tab. A8).

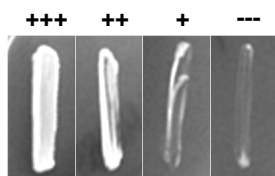


Abbildung 3-11: Semiquantitative Analysen zur Erfassung des Wachstums bei Überexpression von *MDM33*. Das Wachstum der Hefezellen wurde in die vier Stufen +++, ++, + und --- eingeteilt, wobei +++ das stärkste und --- das schwächste vorkommende Wachstum beschreibt.

Um die Ergebnisse für die potentiell interessanten Kandidaten zu verifizieren, wurden Tüpfeltests durchgeführt. Dadurch sollte die Kompensationsintensität genauer erfasst werden. Hierzu wurden serielle Verdünnungen von Zellkulturen mit leerem und Überexpressionsplasmid auf SD- (Minimalmediumplatten mit Glukose als Kohlenstoffquelle) und SGal-Platten getropft (Abb. A1). Die ersten Befunde aus den semiquantitativen Vortests konnten

durch die Tüpfeltests nur bedingt bestätigt werden. Keine der untersuchten Mutanten zeigte bei Überexpression gleichbleibend gutes oder verbessertes Wachstum. Gemäß ihres Wachstumsverhaltens mit dem leeren Plasmid wurden die Stämme $\Delta ydr493w$, $\Delta yer017c$, $\Delta yil157c$ und $\Delta ynl168c$ deshalb als allgemein wachstumsbeeinträchtigt auf SGal (Gruppe 2) identifiziert und die verbleibenden fünf Stämme wurden Gruppe (1) – Wachstumsverschlechterung bei Überexpression – zugeordnet.

Allerdings konnten mit $\Delta ybr039w$, $\Delta ydr061w$, $\Delta ygl080w$, $\Delta ylr091w$ und $\Delta yml030w$ fünf Stämme detektiert werden, bei denen die überexprimierenden Zellen zumindest eine Stufe besser wuchsen als entsprechende Wildtypzellen (Abb. 3-12 A). Unter zusätzlicher Berücksichtigung der Tüpfeltests ergab sich aus den semiquantitativen Wachstumsanalysen bei Überexpression von *MDM33* die in Abb. 3-12 B dargestellte Gesamtverteilung. Für den Großteil der untersuchten Stämme (143 = 87%) wurde ein wildtypanaloger Wachstumsdefekt festgestellt und 10% der Stämme (=16) wiesen einen allgemeinen Defekt auf SGal-Medium auf. Die fünf Deletionen $\Delta ybr039w$ ($\Delta atp3$), $\Delta ydr061w$, $\Delta ygl080w$, $\Delta ylr091w$ und $\Delta yml030w$ bewirkten eine leichte Kompensation des Wachstumsdefekts bei Überexpression von *MDM33* und stellen damit mögliche genetische Interaktionspartner von Mdm33 dar (Tab. 3-5).

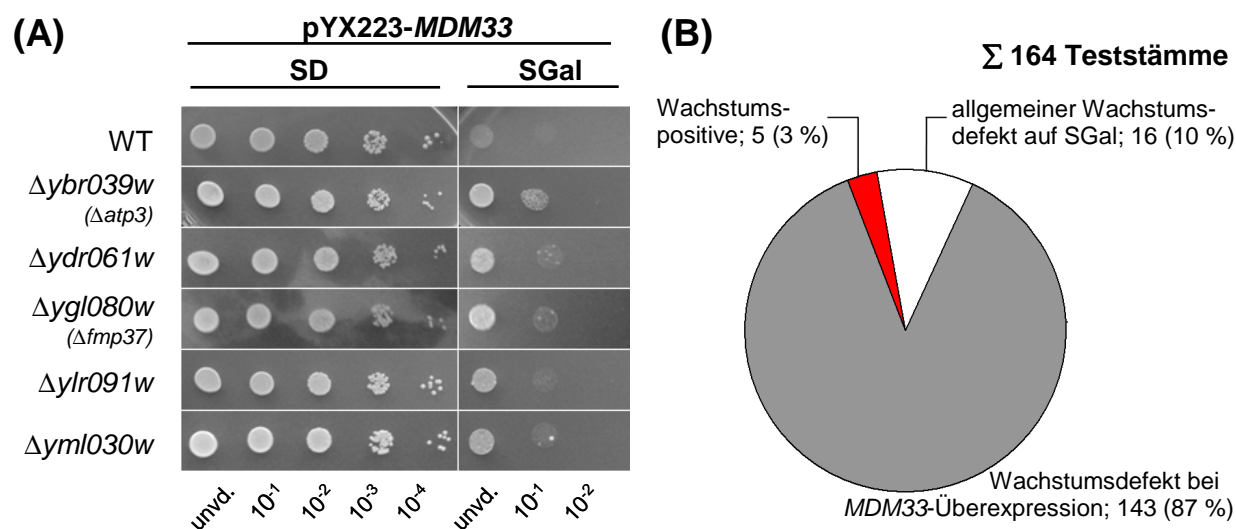


Abbildung 3-12: Wachstum bei Überexpression von *MDM33*. (A) Analyse des Wachstums mittels Tüpfeltests. Von Zellkulturen, die über Nacht in SD-Medium bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 angezogen worden waren, wurden serielle Verdünnungen auf SD- und SGal-Platten aufgetropft und drei Tage bei 30°C inkubiert. Fünf Deletionsstämme zeigen bei Überexpression von *MDM33* leicht besseres Wachstum als der überexprimierende Wildtyp. (B) Gesamtverteilung der Wachstumsphänotypen. Erfasst wurden eine Verschlechterung des Wachstums bei Überexpression (grau), ein allgemeiner Wachstumsdefekt auf SGal (weiß) und verbessertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp bei Überexpression (rot).

Die Detektion der Deletionsmutante $\Delta atp3$ ($\Delta ybr039w$) ist wahrscheinlich nicht die Folge einer spezifischen Interaktion von Atp3 und Mdm33, sondern eines sekundären Effekts. Atp3

ist die γ -Untereinheit des F_1 -Sektors der ATP-Synthase und stellt zusammen mit der Untereinheit ϵ als *central stalk* die Verbindung zwischen dem F_0 - und dem F_1 -Sektor her. In $\Delta atp3$ -Mutanten wurde eine gravierende Destabilisierung des gesamten F_1 -Sektors beobachtet (Paul *et al.*, 1994), was zum Verlust der ATPase-Funktion führt. In Abwesenheit einer funktionellen Elektronentransportkette und/oder eines funktionellen ATP-Synthasekomplexes wird das essentielle elektrische Potential der inneren Mitochondrienmembran durch den Austausch von ATP gegen ADP mittels Adenin Nukleotid Translokator aufgebaut. Der entscheidende Schritt dieses Prozesses ist die Umwandlung von ATP zu ADP in der mitochondrialen Matrix, wobei wahrscheinlich der F_1 -Sektor der ATP-Synthase benötigt wird (Smith & Thorsness, 2005). In der vorliegenden $\Delta atp3$ -Deletionsmutante ist dieser Vorgang deshalb stark beeinträchtigt. Die mangelnde Energetisierung der Membran wiederum wirkt sich negativ auf den mitochondrialen Proteinimport (Truscott *et al.*, 2001) und auch die mitochondriale Fusion aus (Meeusen *et al.*, 2004). Dadurch kommt es zu einer gravierenden Fehlstrukturierung und Fehlfunktion der Mitochondrien (fluoreszenzmikroskopisch ist eine Fragmentierung sichtbar; Tab. A10), die möglicherweise auch durch die *MDM33*-Überexpression nicht weiter verschlechtert werden kann. Allerdings gelangt auch Mdm33 aufgrund des Importdefekts eventuell nur eingeschränkt in die Mitochondrien, sodass der überexpressionsspezifische Wachstumsdefekt vermindert eintritt. Aufgrund der deletionsbedingten Defekte ist das Wachstum der Mutante $\Delta atp3$ auf SGal von vorne herein auch ohne Überexpression stark beeinträchtigt (nur +) und die Überexpression kann nur bedingt einen zusätzlichen negativen Einfluss auf das Wachstum ausüben. Das Wachstum nimmt nur leicht ab. Dadurch aber erscheint das Wachstum bei Überexpression im Vergleich zum Wildtyp verbessert, wo ein Wachstumsarrest eintritt.


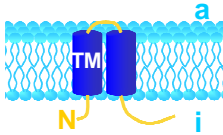

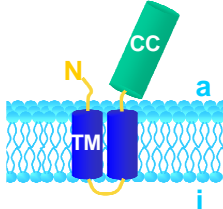
Als potentielle Wechselwirkungspartner von Mdm33 bleiben also die vier uncharakterisierten Proteine Ydr061w, Ygl080w, Ylr091w und Yml030w, die laut GFP-Fusionsstudien (Huh *et al.*, 2003) und Proteomanalysen (Sickmann *et al.*, 2003; Reinders *et al.*, 2006) mitochondrial lokalisiert sind (Tab. 3-5). Für ein besseres Verständnis wurden Datenbankrecherchen und bioinformatische Analysen vorgenommen. Die Kandidatenproteine sind zwischen ~15 und 61 kDa groß (SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002) und bilden mit Ausnahme von Ygl080w vermutlich Coiled-coil-Strukturen aus (Lupas *et al.*, 1991). Über diese Motive wären Wechselwirkungen mit anderen Proteinen inklusive Mdm33 denkbar. Durch Hydropathieanalysen (Hofmann & Stoffel, 1993) wurden für Ygl080w und Yml030w jeweils zwei Transmembranbereiche vorhergesagt, sodass es sich bei ihnen wahrscheinlich um integrale

Membranproteine handelt. Ydr061w besitzt darüber hinaus eine nukleotid-bindende Domäne (NBD) mit Ähnlichkeit zu einem ABC-Motiv (Finn *et al.*, 2008). Allerdings fehlen Transmembrandomänen, wie sie in klassischen ABC-Transportern zu finden sind. Damit ähnelt Ydr061w den transmembranbereichslosen ABC-Motiv-Proteinen Yef3 bzw. Gcn20, die im Cytosol als Translationselongationsfaktor bzw. Translationsregulator fungieren (Bauer *et al.*, 1999). Eine wichtige Rolle von Ydr061w in der mitochondrialen Translation ist jedoch unwahrscheinlich, zumal die Deletionsmutante respiratorische Kompetenz aufweist. Rückschlüsse auf die Funktion von Ydr061w sind also nicht möglich.

Ylr091w wurde im ersten Teilabschnitt der vorliegenden Arbeit als Komponente identifiziert, die essentiell für den Erhalt mitochondrialer DNA ist, und als Rrg5 (*required for respiratory growth*) bezeichnet (3.1.2.2). Die doppelte Detektion im Rahmen dieser Arbeit zeigt eine große Bedeutung dieses Proteins für die mitochondriale Biogenese. Darüber hinaus wurde *YLR091w* kürzlich in einem Screen nach genetischen Interaktionspartnern der Prohibitine erfasst (Osman *et al.*, 2009). Die Prohibitine Phb1 und Phb2 sind zwei homologe Proteine, die in multimeren, hochmolekularen ringförmigen Komplexen in der mitochondrialen Innenmembran vorliegen und regulatorische Funktionen im Rahmen der Zellproliferation sowie der Dynamik und Funktion von Mitochondrien einnehmen. Weiterführende Untersuchungen zur $\Delta ylr091w$ -Mutante zeigten eine veränderte Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Membranen und insbesondere der Anteil an Cardiolipin (CL) und Phosphatidylethanolamin (PE) war deutlich reduziert. Beides sind Phospholipide mit großer Bedeutung für die mitochondriale Struktur und Integrität (Osman *et al.*, 2009). Dementsprechend wurden in der Deletionsmutante veränderte Mitochondrien beobachtet (fluoreszenzmikroskopisch war eine Fragmentierung sichtbar; Tab. A10). Mdm33 ist ein integrales Innenmembranprotein und seine mögliche Rolle als Innenmembranteilungskomponente (Messerschmitt *et al.*, 2003) erfordert eine Umstrukturierung der Membran. Möglicherweise beeinträchtigt die veränderte Lipidzusammensetzung und die damit veränderten Eigenschaften der Membran die Funktionalität von Mdm33.

Die in Tab. 3-5 enthaltenen schematischen Darstellungen fassen die vorhergesagten Strukturmodelle zusammen. Ylr091w ist pilzspezifisch, zu den anderen drei Proteinen existieren Homologe in Pflanzen und/oder Tieren (PSI-BLAST über SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002). Eine Zusammenfassung der Datenbankrecherchen und Strukturvorhersagen ist Tab. A9 zu entnehmen.

Tabelle 3-5: Fünf Hefestämme zeigten eine leichte Kompensation des Wachstumsdefekts bei Überexpression von *MDM33*.

Systematischer Name	Standardname und zelluläre Funktion des Genprodukts	Bioinformatisch vorhergesagte Strukturmotive
<i>YBR039w</i>	<i>ATP3</i> , Untereinheit γ des F_1 -Sektors der F_1F_0 -ATP-Synthase	nicht dargestellt
<i>YDR061w</i>	mitochondriales ^{1,3} Protein unbekannter Funktion	
<i>YGL080w</i>	<i>FMP37</i> , mitochondriales ^{1,2,3} Protein unbekannter Funktion	
<i>YLR091w</i>	<i>RRG5</i> , mitochondriales ^{1,2,3} Protein; mögliche Beteiligung am mtDNA-Erhalt	
<i>YML030w</i>	<i>AIM31</i> , mitochondriales ^{1,2,3} Protein unbekannter Funktion	

Angegeben sind der systematische und der Standardname der entsprechenden deletierten Gene sowie Funktionen der Genprodukte und durch bioinformatische Analysen erhaltene Strukturmotive der bisher uncharakterisierten Proteine, wie Coiled-coil-Domänen (CC; Lupas *et al.*, 1991), Transmembrandomänen (TM; Hofmann & Stoffel, 1993) und die in Ydr061w enthaltene ABC-Transporterdomäne (Finn *et al.*, 2008). Die wahrscheinliche Membranorientierung ist durch a (Membranaußenseite) und i (Membraninnenseite) gekennzeichnet. Es ist unbekannt in welcher der beiden mitochondrialen Membranen die Proteine lokalisiert sind. Die N-Termini sind mit N markiert. Mitochondrial: Aussage aus GFP-Fusionsstudien nach ¹Huh *et al.* (2003) und/oder aus Proteomanalysen nach ²Sickmann *et al.* (2003) und ³Reinders *et al.* (2006). AIM: *altered inheritance rate of mitochondria*; FMP: *found in mitochondrial proteome*; RRG: *required for respiratory growth*.

3.2.1.2 Mitochondriale Morphologie bei Überexpression von *MDM33*

Zusätzlich zur Wachstumsbeeinträchtigung tritt bei Überexpression von *MDM33* auch eine Zerstörung des mitochondrialen Netzwerkes auf. In Wildtyp- und $\Delta mdm33$ -Zellen bewirkt die galaktoseinduzierte Überexpression von *MDM33* eine Fragmentierung und Aggregation von Mitochondrien (Messerschmitt *et al.*, 2003; vgl. Abb. 3-14 A). Auch hier sollte das Fehlen eines Mdm33-Wechselwirkungspartners zur Kompensation des Überexpressionsdefekts führen. Deshalb wurde als weiterer Parameter die Mitochondrienmorphologie der Teststämme untersucht. Für die Beurteilung der Organellenmorphologie wurden Stämme verwendet, die

neben pYX223 bzw. pYX223-*GAL-MDM33* auch mit pVT100U-mtGFP transformiert waren. Dieses Plasmid exprimiert GFP mit mitochondrialer Präsequenz und ruft damit eine stabile mitochondriale Fluoreszenzfärbung hervor. Die Anzucht der Zellen erfolgte unter Selektionsdruck auf SGal-Minimalmedium, um einen Verlust des Überexpressionsplasmids zu verhindern. Die mitochondriale Morphologie mit und ohne Überexpression wurde für jeden Stamm im Vergleich zueinander beurteilt. Dabei wurde unterschieden zwischen (1) Fragmentierung/Aggregation durch Überexpression, (2) bereits mit leerem Plasmid überexpressionsähnliche Mitochondrien und (3) Präsenz wildtypischer Mitochondrien trotz Überexpression. Jeder Stamm wurde für ein zuverlässiges Ergebnis in mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten untersucht. Daraus ergab sich die in Abb. 3-13 dargestellte Gesamtverteilung.

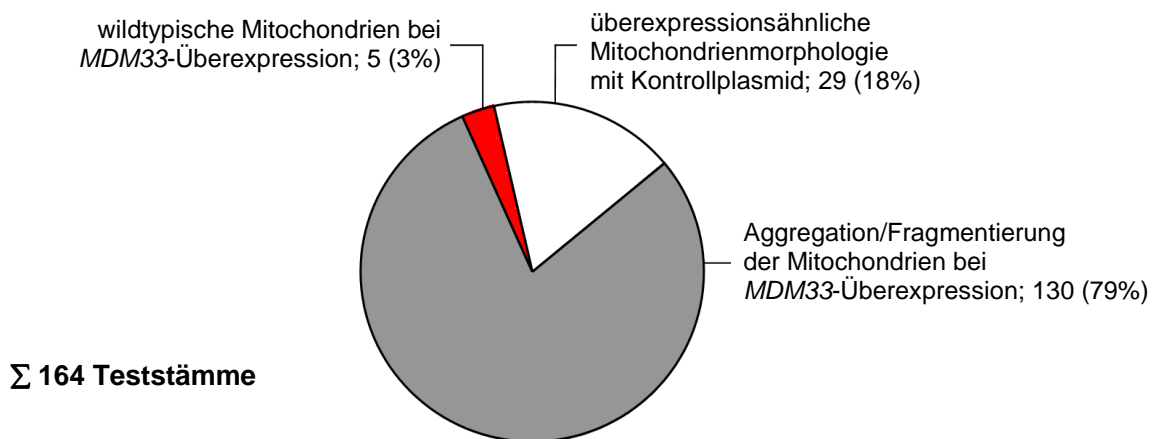


Abbildung 3-13: Verteilung der mitochondrialen Morphologie bei Überexpression von *MDM33*. Unterschieden wurden überexpressionsähnliche Mitochondrienmorphologie (=fragmentiert, aggregiert oder sphärisch) bereits mit Kontrollplasmid, d.h. ohne Überexpression von *MDM33* (weiß), *MDM33*-überexpressionsbedingte Fragmentierung/Aggregation von Mitochondrien (grau) und partieller Erhalt wildtypischer, tubulärer Mitochondrien bei *MDM33*-Überexpression (rot).

Der Großteil der 164 Teststämme verhielt sich analog zum Wildtyp bzw. zur $\Delta m d m 3 3$ -Mutante und zeigte eine überexpressionsbedingte Fragmentierung und Aggregation der Mitochondrien (Abb. 3-14 A und B). Darunter waren auch Deletionsmutanten mitochondrialer Morphologiekomponenten, bei denen ein Übergang von netz- (z. B. $\Delta f i s 1$) oder nestartigen (z. B. $\Delta n u m 1$), tubulären Strukturen zum Überexpressionsphänotyp erfolgte (Abb. 3-14 C).

Darüber hinaus besaßen 18% der Stämme (=29) bereits ohne Überexpression fragmentierte, aggregierte oder sphärische, also überexpressionsähnliche Mitochondrien (Abb. 3-14 D). Für sieben Deletionen war dies bereits bekannt, zumal die jeweils fehlenden Proteine der mitochondrialen Fusions- bzw. Tubulationsmaschinerie zuzuordnen sind: Fzo1

(Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998), Mdm30 (Fritz *et al.*, 2003), Mgm1 (Wong *et al.*, 2000) bzw. Mmm1 (Burgess *et al.*, 1994), Mdm12 (Berger *et al.*, 1997), Mdm31 und Mdm32 (Dimmer *et al.*, 2005) (Übersicht in Okamoto & Shaw, 2005; Merz *et al.*, 2007; Westermann, 2008). Durch weiterführende Analysen (Daten nicht gezeigt) konnten für die übrigen 22 Deletionsmutanten sekundäre Effekte als Ursachen der mitochondrialen Fragmentierung ermittelt werden.

Als „positive“ Kandidaten gewertet wurden wiederum Stämme der dritten Gruppe, die nach Überexpression zu einem höheren Prozentsatz als der Wildtyp (>6,2%) tubuläre Mitochondrien aufwiesen. Mit $\Delta ybr163w$, $\Delta yer004w$, $\Delta mdv1$, $\Delta ylr356w$ und $\Delta yml030w$ wurden fünf Kandidaten identifiziert, die mit einem Anteil von 16,3% bis 50,2% dieses Kriterium erfüllten (Abb. 3-14 E bis I; Tab. 3-6). Darunter waren auch der Deletionsstamm $\Delta yml030w$, der bereits in den Wachstumsanalysen bei Überexpression gefunden wurde, und der Deletionsstamm $\Delta mdv1$, dem eine Komponente der mitochondrialen Teilungsmaschinerie fehlt. In einer zweiten Transformation der fünf Stämme konnten die mitochondrialen Befunde reproduziert werden. Es handelt sich also um spezifische Effekte.

Tabelle 3-6: Fünf Deletionsstämme können die Überexpression von *MDM33* teilweise kompensieren und besitzen zu einem vermehrten Prozentsatz wildtypische Mitochondrien.

Systematischer Name	Standardname und zelluläre Funktion des Genprodukts	mt Morphologie; Anteil der Zellen in (%)	
		tubulär	fragm.-aggr.
<i>YBR163w</i>	<i>DEM1</i> ; mitochondriales Protein unbekannter Funktion	16,7	83,3
<i>YER004w</i>	<i>FMP52</i> ; mitochondriales ⁴ Außenmembranprotein unbekannter Funktion	16,3	83,7
<i>YJL112w</i>	<i>MDV1</i> ; peripheres mitochondriales Außenmembranprotein; mitochondriale Teilung und Erhalt der mitochondrialen Morphologie	50,2	49,8
<i>YLR356w</i>	mitochondriales ¹ Protein unbekannter Funktion	19,0	81,0
<i>YML030w</i>	<i>AIM31</i> ; mitochondriales ^{1,2,3} Protein unbekannter Funktion	23,9	76,1
Wildtyp BY4742	Kontrollauszählung	6,2	93,8

Angegeben sind systematische und Standardnamen der entsprechenden Gene sowie Funktionen der Genprodukte und die quantitative Erfassung der Mitochondrienmorphologie nach Überexpression von *MDM33*. Die Zellen wurden über Nacht bei 30°C in SGal-Medium angezogen. Auszählungen wurden in zwei unabhängigen Experimenten vorgenommen, wobei jeweils n>100 Zellen bewertet wurden. Ohne Überexpression lagen in allen Fällen ~95% tubuläre, wildtypische Mitochondrien bzw. für $\Delta mdv1$ die deletionsspezifischen engmaschigen Netze vor. Im Fall von $\Delta mdv1$ sind in „tubulär“ auch 13,9% der deletionsspezifischen engmaschigen Netze enthalten. Mitochondrial: Aussage aus GFP-Fusionsstudien nach ¹Huh *et al.* (2003) und Proteomanalysen nach ²Sickmann *et al.* (2003), ³Reinders *et al.* (2006) und ⁴Zahedi *et al.* (2006). AIM: *altered inheritance rate of mitochondria*; DEM: *defects in morphology*; FMP: *found in mitochondrial proteome*; fragm.-aggr.: fragmentiert-aggregiert; MDV: *mitochondrial division*.

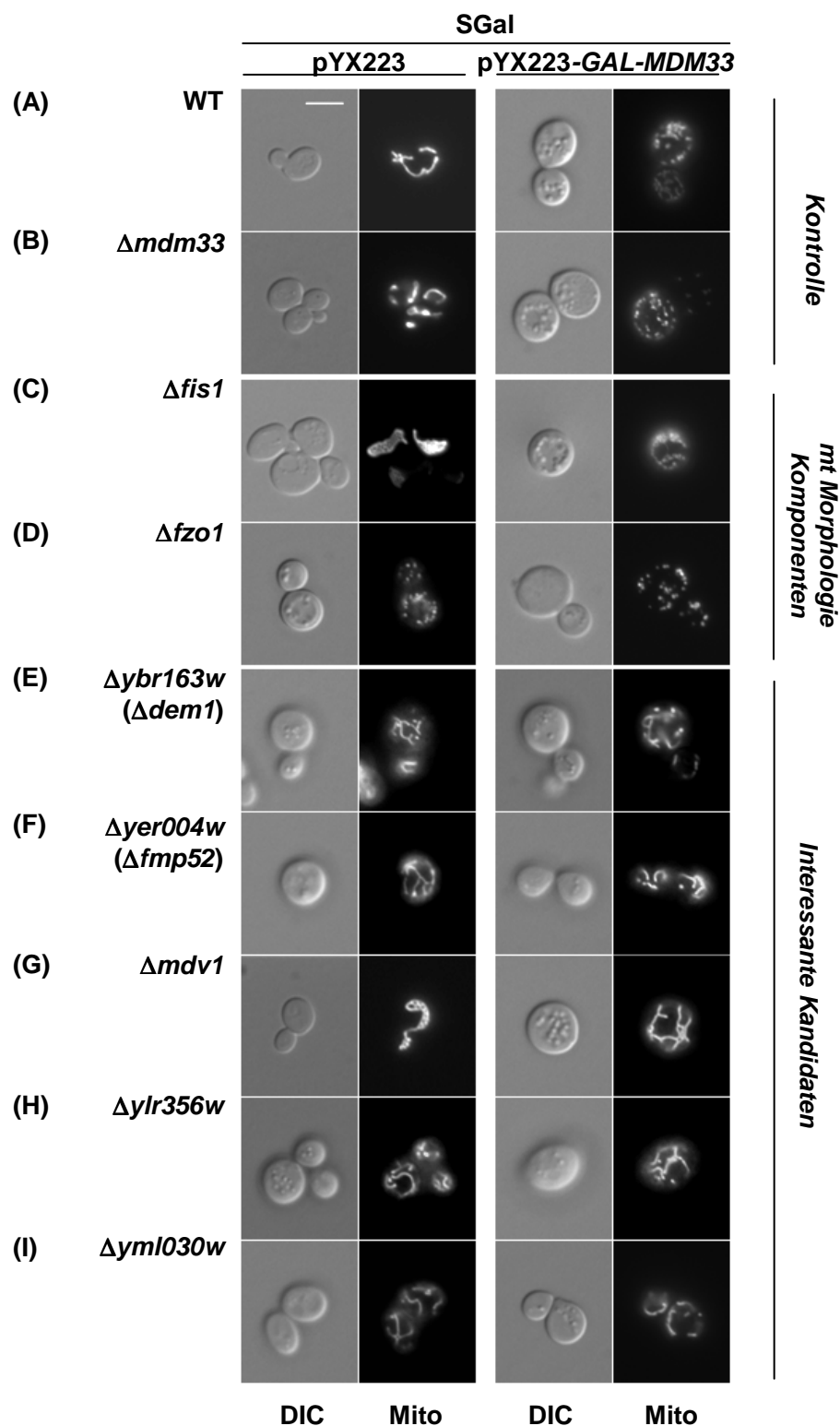


Abbildung 3-14: Mitochondriale Morphologie mit und ohne Überexpression von *MDM33*. Mit pYX223 bzw. pYX223-GAL-MDM33 und pVT100U-mtGFP transformierte Zellen wurden über Nacht bei 30°C in flüssigem SGal-Medium bis zur log arithmetischen Wachstumsphase angezogen und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Jedes Bildpaar besteht aus einer Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC) und einer Fluoreszenzaufnahme der mtGFP-gefärbten Mitochondrien (Mito). Der Größenbalken stellt 5 µm dar. In WT- und $\Delta mdm33$ -Zellen (A und B) kommt es, ebenso wie in der Teilungsmutante $\Delta fis1$ (C), zu einer überexpressionsbedingten Fragmentierung der Mitochondrien. In mt-fusionsinkompetenten $\Delta fzo1$ -Zellen (D) liegen bereits mit dem leeren Plasmid die mutationsspezifischen Mitochondrienfragmente vor. Die als interessant eingestuft Kandidatenstämme (E-I) weisen auch bei Überexpression zu einem bestimmten Anteil wildtypische Strukturen auf.

Durch die Analyse der mitochondrialen Morphologie bei Überexpression von *MDM33* wurden also insgesamt vier bisher uncharakterisierte Proteine (Ybr163w, Yer004w, Ylr356w und Yml030w) als mögliche funktionelle oder direkte Interaktionspartner von Mdm33 gefunden. Eine funktionelle Charakterisierung der entsprechenden Deletionsmutanten (siehe 3.2.2) sollte tiefere Einblicke in diese Beziehungen liefern.

Als *MDM33*-überexpressionstolerant wurde zudem die Deletionsmutante $\Delta mdv1$ identifiziert. Dieser Stamm zeigte mit 50,2% die deutlichste Kompensation der überexpressionsspezifischen Mitochondrienfragmentierung. Das fehlende Protein Mdv1 ist zwar aufgrund seiner Lage an der cytoplasmatischen Seite der Außenmembran sicherlich kein direkter Wechselwirkungspartner von Mdm33. Da es sich aber hierbei um eine Komponente der mitochondrialen Außenmembranteilungsmaschinerie handelt, kann ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Mdm33-Funktion und der Außenmembranteilung hergestellt werden. Dies stimmt mit Ergebnissen aus Doppeldeletionsstudien überein, in denen eine epistatische Beziehung von $\Delta mdm33$ zu $\Delta fis1$ gezeigt wurde, einem Gen, das ebenfalls für eine Komponente der Außenmembranteilungsmaschinerie kodiert (Messerschmitt *et al.*, 2003). Die Blockierung der Mdm33-Wirkung im vorliegenden $\Delta mdv1$ -Stamm legt nahe, dass die Tätigkeit der Außenmembranteilungsmaschinerie in die überexpressionsspezifische Fragmentierung/Aggregation der Mitochondrien involviert ist. Dieser Phänotyp ist charakteristisch für eine Verschiebung des Fusions-Teilungs-Gleichgewichts in Richtung Teilung und könnte durch eine Mdm33-stimulierte, vermehrte Aktivität der Außenmembranteilungsmaschinerie zustande kommen. Dies entspräche dem bestehenden Wirkmodell von Mdm33 als Innenmembranteilungskomponente, die *upstream* der Außenmembranteilungsmaschinerie durch Teilung und/oder *Constriction* der inneren Mitochondrienmembran eine Teilung der Außenmembran ermöglicht (Messerschmitt *et al.*, 2003). Eine vermehrte Expression von *MDM33* erhöht also die Frequenz der Innenmembranteilung/Bildung von *Constrictions* und zieht damit eine vermehrte Außenmembranteilung nach sich.

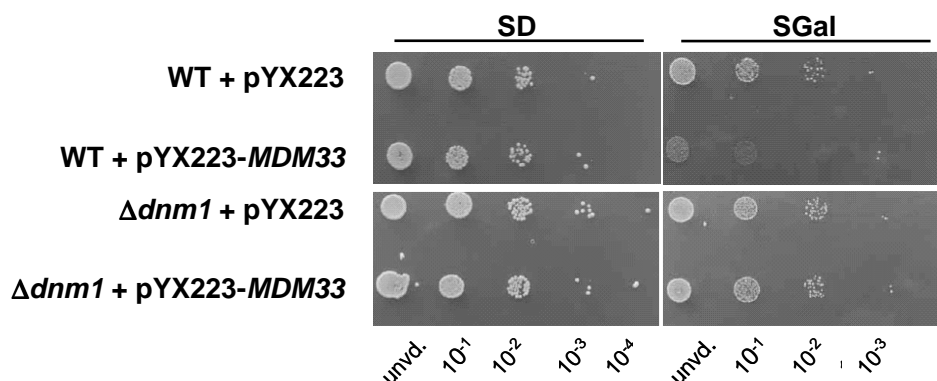
Die mitochondriale Außenmembranteilungsmaschinerie besteht aus dem Membrananker Fis1, den orthologen Adapterproteinen Mdv1 und Caf4 und der dynaminähnlichen GTPase Dnm1 (vgl. 1.6.2). Teilung wird letztendlich durch die Bildung mitochondrienumschließender Dnm1-Spiralen und mechanochemische Abschnürung des Mitochondrientubulus vermittelt (Ingeman *et al.*, 2005). Dafür ist die Aktivierung der Teilungskomplexe erforderlich, die vermutlich durch Mdv1 erfolgt (Naylor *et al.*, 2006). Die große *MDM33*-Überexpressionstoleranz von $\Delta mdv1$ -Mutanten lässt sich durch ein Fehlen dieser Aktivierung erklären. Die beobachtete Restteilungsaktivität (in 50% der Zellen Fragmentierung) wird

möglicherweise durch das Mdv1-Orthologe Caf4 vermittelt. Im Normalfall besitzen Caf4-enthaltende Teilungskomplexe keine Teilungsaktivität (Griffin *et al.*, 2005). Im Zusammenspiel mit der übermäßigen Mdm33-Funktion könnte jedoch trotzdem eine Dnm1-Spiralisierung mit anschließender Teilung möglich sein.

Auch die Deletionsstämme $\Delta fis1$ und $\Delta dnm1$ wurden im Rahmen dieser Arbeit auf Überexpressionstoleranz hin untersucht. In beiden Fällen erfolgte keine Kompensation der Überexpression, was zunächst widersprüchlich erscheint. Im Fall von $\Delta fis1$ -Zellen findet allerdings eine stabile mitochondriale Restbindung von Mdv1 und Dnm1 statt (Jakobs *et al.*, 2003a). Im Überexpressionszustand könnte diese möglicherweise ausreichen, um eine mitochondriale Teilung und damit den beobachteten Überexpressionsphänotyp auszubilden. Überraschend war allerdings, dass bei Fehlen der Hauptteilungskomponente Dnm1 eine *MDM33*-überexpressionsbedingte Fragmentierung/Aggregation der Mitochondrien eintrat. Dies widerspricht dem bisherigen Verständnis der Teilungsmaschinerie. Denkbar ist, dass der zunächst verwendete Bibliotheksstamm falsch ist. Die Tatsache, dass bereits ohne Überexpression fragmentierte Mitochondrien vorlagen (Tab. A10), deutet darauf hin, zumal Mitochondrien in $\Delta dnm1$ -Zellen im Normalfall charakteristische engmaschige Netze ausbilden. Deshalb wurde ergänzend eine weitere $\Delta dnm1$ -Mutante (BY4743; homozygot diploid) bei Überexpression von Mdm33 untersucht. In Tüpfeltests wuchsen diese Zellen sowohl mit dem leeren Kontrollplasmid als auch mit dem Überexpressionsplasmid auf SGal-Medium bis zur letzten Verdünnungsstufe (Abb. 3-15). Darüber hinaus wurden auch im Überexpressionsfall annähernd 100% der deletionsspezifischen, fischernetzähnlichen Mitochondrien erfasst (Abb. 3-15). Die Deletion der Teilungsschlüsselkomponente *DNM1* bewirkt also eine vollständige Kompensation der *MDM33*-Überexpressionswirkung und ist damit noch effektiver als die im Screen deutlichste Kompensationsleistung der $\Delta mdv1$ -Mutation (50% der Zellen mit tubulären Strukturen bei Überexpression). Dies stimmt mit dem essentiellen Charakter von Dnm1 in der Außenmembranteilung und der teilweise funktionellen Redundanz von Mdv1 und Caf4 überein. Die neuen Ergebnisse mit der zusätzlichen $\Delta dnm1$ -Mutante untermauern damit die im Zusammenhang mit Mdv1 diskutierten Punkte: (1) Der fluoreszenzmikroskopisch sichtbare *MDM33*-Überexpressionsphänotyp entsteht letztendlich durch vermehrte Aktivität der Außenmembranteilungsmaschinerie. (2) Die Funktion von Mdm33 beeinflusst also die Aktivität der Außenmembranteilungsmaschinerie, was (3) mit dem aktuellen Wirkmodell (Messerschmitt *et al.*, 2003) übereinstimmt. In Kapitel 3.2.3 wurden deshalb weitere Untersuchungen

vorgenommen, um den Einfluss von Mdm33 auf die Außenmembranteilungsmaschinerie zu erfassen.

(A)



(B)

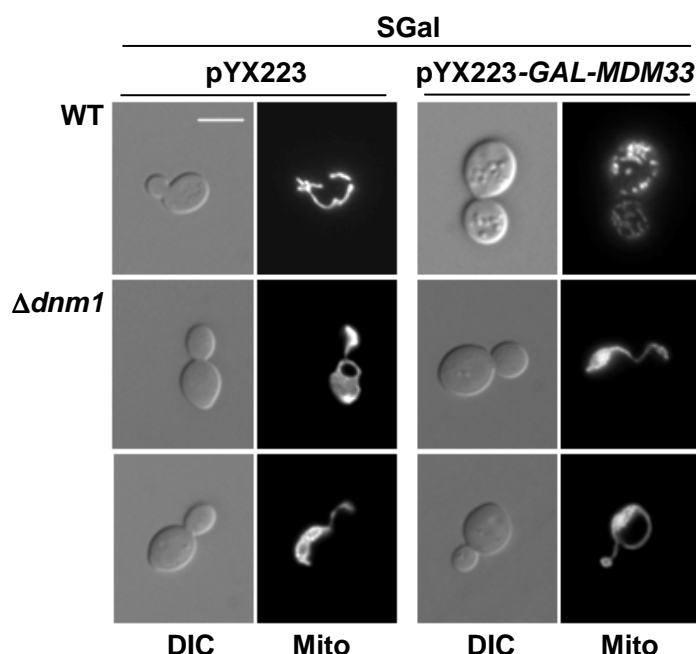


Abbildung 3-15: Die homozygot diploide $\Delta dnm1$ -Mutante kompensiert die $MDM33$ -Überexpressionsdefekte. (A) Das Wachstum mit und ohne Überexpression auf SGal-Platten wurde mittels Tüpfeltests erfasst. Von Zellkulturen, die über Nacht in SD-Medium bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 angezogen worden waren, wurden serielle Verdünnungen auf SD- und SGal-Platten aufgetropft und drei Tage bei 30°C inkubiert. Die Mutante zeigt im Gegensatz zum Wildtyp mit und ohne Überexpression gleichgutes Wachstum. **(B)** Mitochondriale Morphologie der Zellen mit und ohne Überexpression von $MDM33$. Jedes Bildpaar besteht aus einer Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC) und einer Fluoreszenzaufnahme der mtGFP-gefärbten Mitochondrien (Mito). Der Größenbalken stellt 5 μ m dar. Bei Überexpression von $MDM33$ in Wildtypzellen (pYX223-GAL- $MDM33$) werden die tubulären Netzwerke zerstört und es entstehen fragmentiert-aggregierte Mitochondrien. Die Deletion von $DNM1$ unterbricht die Mdm33-Wirkkaskade, sodass sowohl vor als auch nach Überexpression die deletionsspezifischen fischernetzähnlichen Strukturen vorliegen.

Unter Berücksichtigung der Wachstumsanalysen und der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen lieferte der gesamte überexpressionsbasierende Screen sieben bisher

uncharakterisierte Gene mit genetischer Beziehung zu *MDM33* (vier bei Beurteilung des Wachstums und vier bei Beurteilung der Mitochondrienstruktur, wobei ein Deletionsstamm in beiden Herangehensweisen detektiert werden konnte). Damit wurden vielversprechende Kandidaten für eine mögliche Interaktion mit der Innenmembranteilungskomponente Mdm33 gefunden. Über Mdv1 (und Dnm1) konnte darüber hinaus erneut ein Zusammenhang mit der Außenmembranteilungsmaschinerie hergestellt werden. Die überschaubare Anzahl an Positiven (<5% der untersuchten Stämme) beweist die Stringenz, und die Detektion von $\Delta dnm1$ und $\Delta mdv1$ die Spezifität des vorgenommenen genetischen Screens.

3.2.2 Untersuchung der *MDM33*-überexpressionstoleranten Stämme mit partiellem Erhalt von Wildtypmitochondrien

Durch die Wachstums- und Mitochondrienuntersuchungen bei Überexpression von *MDM33* wurden sieben bisher uncharakterisierte Gene identifiziert, die in genetischer Beziehung zu *MDM33* stehen und damit einen Wechselwirkungspartner der mitochondrialen Innenmembranteilungsmaschinerie kodieren könnten. Da sich im Zuge der mitochondrialen Analysen eine deutlichere Kompensation des *MDM33*-Überexpressionsdefekts zeigte, wurden zunächst diese Kandidatenstämme ($\Delta ybr163w$, $\Delta yer004w$, $\Delta ylr356w$ und $\Delta yml030w$) näher untersucht.

3.2.2.1 Besteht ein Zusammenhang zwischen der Kompensation des überexpressionsspezifischen Wachstums- und Mitochondriendefekts?

Zunächst sollte die Frage geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Kompensation des Wachstums- und des Mitochondriendefekts bei Überexpression von *MDM33* besteht. Für den Deletionsstamm $\Delta yml030w$ scheint dies der Fall zu sein, da er sowohl bei Analyse des Wachstums als auch der Mitochondrienmorphologie bei Überexpression von *MDM33* gefunden wurde. Die übrigen Stämme mit partiell wildtypischen Mitochondrien bei Überexpression von *MDM33* zeigten in den bisher vorgenommenen semiquantitativen Analysen keine Verbesserung des Wachstums. Um dies noch einmal zu überprüfen, wurden serielle Verdünnungen von Transformanten mit leerem und Überexpressionsplasmid auf SD- und SGal-Platten getropft (Abb. 3-16).

Auf SD-Medium wuchsen der Wildtyp und alle Deletionsmutanten unabhängig vom enthaltenen Plasmid bis zur letzten Verdünnungsstufe. Das Gleiche galt unter induzierenden Bedingungen (SGal) für alle Stämme mit dem leeren Kontrollplasmid. Bei Überexpression von *MDM33* trat der spezifische Wachstumsarrest ein. Dieser war beim Wildtyp am stärksten

ausgeprägt. Wie bereits in den ersten durchgeführten Tüpfeltests (vgl. Abb. 3-12 A) zeigte $\Delta yml030w$ erneut eine leichte Kompensation und konnte um eine Verdünnungsstufe besser wachsen als der Wildtyp. Interessanterweise waren die übrigen getesteten Stämme $\Delta ybr163w$, $\Delta yer004w$ und $\Delta ylr356w$ im gleichen Maße in der Lage, die *MDM33*-Überexpression zu tolerieren. Auch für $\Delta mdv1$, der als weiterer Deletionsstamm mit WT-Mitochondrien bei Überexpression gefunden wurde, konnte eine entsprechende Wachstumskompensation detektiert werden (Abb. 3-16).

Die Wachstumsexperimente deuten darauf hin, dass ein partieller Erhalt der wildtypischen Mitochondrienstruktur auch eine Wachstumsverbesserung begünstigt. Der Umkehrschluss, dass alle Wachstumspositiven auch wildtypische Mitochondrien aufweisen, ist hingegen nicht gültig. In allen entsprechenden Deletionsstämmen lagen die Mitochondrien fragmentiert vor, was bei $\Delta ygl080w$ erst bei Überexpression und bei den anderen drei ($\Delta atp3$, $\Delta ydr061w$, $\Delta ylr091w$) schon vorher zu beobachten war (Tab. A10).

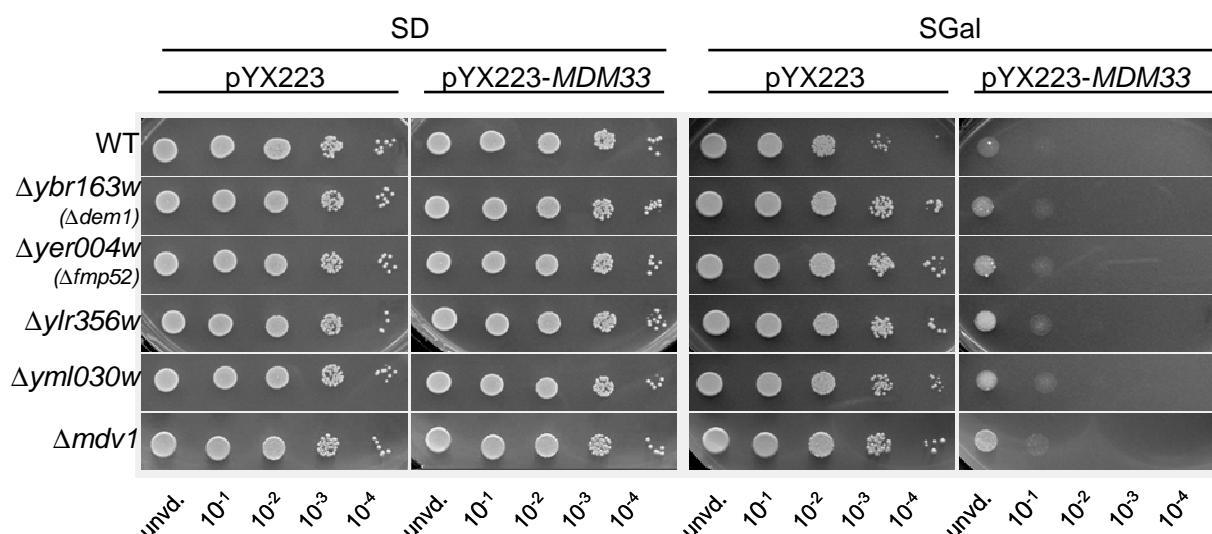


Abbildung 3-16: Die identifizierten Mutanten kompensieren bei *MDM33*-Überexpression zusätzlich zur mitochondrialen Fragmentierung auch den spezifischen Wachstumsarrest. Für das Erstellen von Tüpfeltests wurden von Zellkulturen, die über Nacht in SD-Medium bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 angezogen worden waren, serielle Verdünnungen auf SD- und SGal-Platten aufgetropft und zwei bzw. vier Tage bei 30°C inkubiert.

3.2.2.2 Bioinformatische Analysen und Datenbankrecherchen

Strukturvorhersagen, Sequenzvergleiche und Datenbankrecherchen sollten erste Informationen über die in den Deletionsmutanten fehlenden mitochondrialen Proteine liefern. Daraus ging hervor, dass die Proteine zwischen ~18 und 68 kDa groß sind (SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002) und alle über mindestens eine Transmembrandomäne verfügen (Hofmann & Stoffel, 1993). Bei Lokalisation in der Innenmembran würde also eine räumliche Nähe zu

Mdm33 bestehen. Zudem könnten Yml030w und Ybr163w durch mögliche Coiled-coil-Strukturen (Lupas *et al.*, 1991) Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eingehen (Abb. 3-17; Tab. A9). Zu Yer004w und Ylr356w existieren ausschließlich Pilzhomologe, wohingegen für Ybr163w und Yml030w auch Verwandte in Pflanzen und Tieren vorkommen (PSI-BLAST über SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002). Für ein tieferes Verständnis der Proteinfunktionen wurde im Folgenden eine funktionelle Charakterisierung der entsprechenden Deletionsstämme vorgenommen.

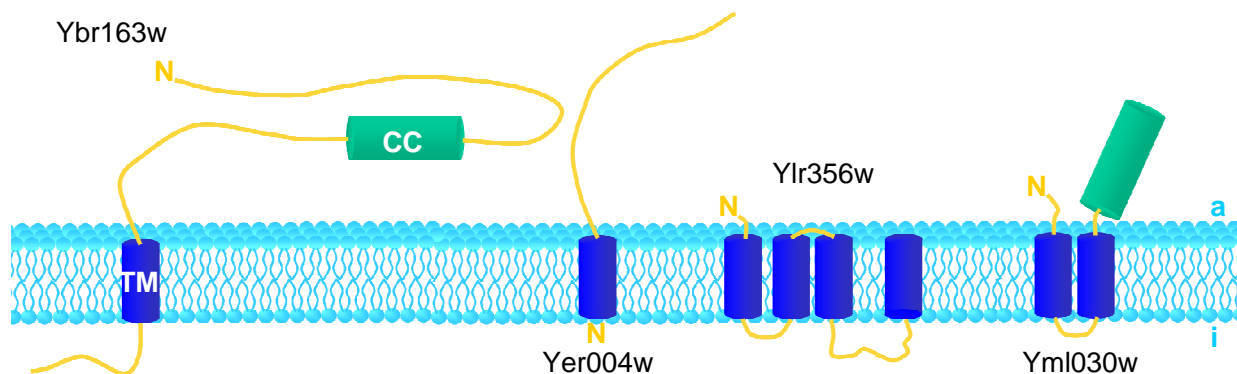


Abbildung 3-17: Strukturelle Eigenschaften der identifizierten Kandidatenproteine gemäß Vorhersage. Angegeben sind Strukturmodule, wie Coiled-coil-Domänen (CC; Lupas *et al.*, 1991) und Transmembrandomänen (TM; Hofmann & Stoffel, 1993). Die Membranorientierung ist durch a (Membranaußenseite) und i (Membraninnenseite) gekennzeichnet. Yer004w liegt in der Außenmembran (Zahedi *et al.*, 2006). Für die übrigen Proteine ist unbekannt, in welcher der beiden mitochondrialen Membranen sie lokalisiert sind.

3.2.2.3 Funktionelle Charakterisierung

Erfassung der mitochondrialen Morphologie auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Bei Deletion von *MDM33* kann das mitochondriale Netzwerk nicht mehr aufrechterhalten werden und es entstehen ring- und hohlkugelähnliche Organellen. Im Zuge der Überexpressionsstudien zeigten die Deletionsstämme ohne Überexpression auf SGal-Medium keine veränderte mitochondriale Morphologie. Um dies umfassend zu klären, wurden mtGFP-exprimierende Zellen in Vollmedium auf drei verschiedenen Kohlenstoffquellen (Glukose, Galaktose und Glyzerin) fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Tab. 3-7). Als Hauptphänotyp waren dabei, unabhängig von der Kohlenstoffquelle, stets zwischen 94% und 99% tubuläre, wildtypische Mitochondrien vorhanden. Die übrigen morphologischen Ausprägungen können mit <3%, wie sie auch in Wildtypkulturen auftreten, als unauffällig vernachlässigt werden. Ring- oder Hohlkugelstrukturen wurden nie gefunden.

Einzig auffällig war das Verhalten von $\Delta yml030w$ auf YPG. Der Anteil an knospenden Zellen lag bei nur etwa 50% der Gesamtkultur, und die vorhandenen knospenden Zellen zeigten zu einem Anteil von 16% fragmentiert-aggregierte Mitochondrien. Auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle sind Mitochondrien und ihre Funktion besonders wichtig. Unter diesen Bedingungen leistet das Protein Yml030w möglicherweise einen Beitrag zum mitochondrialen Funktions- und/oder Morphologieerhalt.

Tabelle 3-7: Die Deletion der identifizierten, möglichen Wechselwirkungspartner von Mdm33 hat keine starke Auswirkung auf die mitochondriale Morphologie.

Stamm	mitochondriale Morphologie (Anteil der Zellen in %)								
	auf YPD			auf YPGal			auf YPG		
	tubulär	fragm.- aggr.	aggr. Tubuli	tubulär	fragm.- aggr.	aggr. Tubuli	tubulär	fragm.- aggr.	aggr. Tubuli
BY4742	98,3 ± 0,5	1,7 ± 0,5	---	98,7 ± 1,2	1,3 ± 1,2	---	99,3 ± 0,5	0,7 ± 0,5	---
$\Delta ybr163w$	96,6 ± 0,5	2,7 ± 0,8	0,7 ± 0	97,7 ± 0,5	1,0 ± 0,8	1,3 ± 0,5	96,3 ± 0,9	0,7 ± 0,5	3,0 ± 0,8
$\Delta yer004w$	95,4 ± 1,2	2,3 ± 0,5	2,3 ± 1,2	98,4 ± 0,5	1,3 ± 0,5	0,3 ± 0,5	94,3 ± 1,2	2,0 ± 0,8	3,7 ± 0,9
$\Delta ylr356w$	96,3 ± 1,2	1,0 ± 0,8	2,7 ± 0,9	97,7 ± 0,5	1,0 ± 0,8	1,3 ± 0,9	97,3 ± 0,5	1,7 ± 0,5	1,0 ± 0,8
$\Delta yml030w$	96,3 ± 0,5	1,7 ± 0,5	2,0 ± 0,8	96,6 ± 0,9	1,7 ± 1,2	1,7 ± 1,7	83,7 ± 4,5	16,3 ± 4,5	---

mtGFP-exprimierende Zellen wurden über Nacht in YPD-, YPG- oder YPGal-Medium bei 30°C angezogen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (fragm. = fragmentiert; aggr. = aggregiert). Angegeben sind Durchschnittswerte aus drei Auszählungen pro Nährmedium (n jeweils ≥ 100) mit Standardabweichungen.

Die Deletion aller möglichen Wechselwirkungspartner hat, anders als die von *MDM33*, keinen starken Effekt auf die Mitochondrienstruktur. Demnach spielen die entsprechenden Proteine keine fundamentale Rolle als Morphologiekomponenten. Denkbar wäre eventuell eine lokale Beschränkung des Effekts auf die Innenmembran, die elektronenmikroskopisch nachweisbar wäre.

Wachstum auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle

Bei der Anzucht von $\Delta yml030w$ -Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie waren in den YPG-Kulturen stets <50% knospende Zellen enthalten, was auf einen leichten Wachstumsdefekt hindeutet. Deshalb wurde das Wachstumsverhalten dieses Stamms auf YPD und YPG jeweils bei der Standardkultivierungstemperatur von 30°C und unter Stressbedingungen bei 37°C erfasst. Dafür wurden Wachstumskurven erstellt, aus denen für eine gute Auflösung auch geringer Defekte die exakten Generationszeiten berechnet wurden (Abb. 3-18). Die ebenfalls

identifizierten Deletionsstämme $\Delta ybr163w$, $\Delta yer004w$ und $\Delta ylr356w$ wurden für eine weiterführende Charakterisierung untersucht.

Auf fermentierbarer Kohlenstoffquelle (YPD) konnten unabhängig von der Kultivierungstemperatur keine Defekte festgestellt werden. Alle Mutanten zeigten wildtypisches Verhalten und wiesen Generationszeiten von ~1,5 h (30°C) und ~1,9 h (37°C) auf (Abb. 3-18). Im Gegensatz dazu wurden unter nicht-fermentierbaren Bedingungen (YPG) Wachstumsdefizite deutlich. Bereits bei 30°C wurde für alle Stämme ein Wachstumsdefekt detektiert, der für $\Delta yml030w$ am stärksten ausgeprägt war (g = 9,3 h anstelle von 4,5 h für den WT). Unter Stress (37°C) lagen die Generationszeiten der Deletionsstämme mit 9,3-10,1 h fast doppelt so hoch wie die des Wildtyps. Eine Ausnahme bildete lediglich der Stamm $\Delta ybr163w$, bei dem die Verdopplungszeit bei 30°C und 37°C jeweils ~6,3 h betrug (Abb. 3-18).

Insgesamt bestätigt sich somit der in der Anzucht für die Fluoreszenzmikroskopie angedeutete respiratorische Defekt von $\Delta yml030w$. Zusätzlich wurde auch für alle anderen Mutanten ein leichtes Wachstumsdefizit auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle ermittelt.

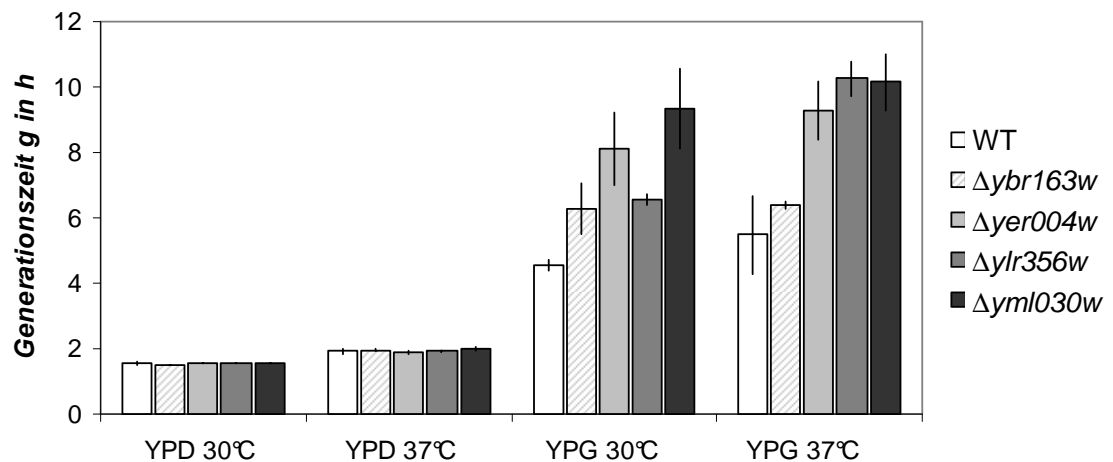


Abbildung 3-18: Alle identifizierten Mutanten weisen leichte respiratorische Defekte auf. YPD- und YPG-Flüssigkulturen wurden bei den angegebenen Temperaturen inkubiert, wobei stündlich die OD₆₀₀ erfasst wurde. Durch halblogarithmische Auftragung der OD-Werte gegen die Zeit wurden Wachstumskurven erstellt, die zur Berechnung der Generationszeiten verwendet wurden. Aufgetragen sind gemittelte Generationszeiten aus jeweils zwei Experimenten mit Standardabweichungen.

Analyse der mitochondrialen DNA mittels DAPI-Färbung

Eine häufige Ursache von respiratorischen Defekten, ist der komplette [ρ^0] oder partielle [ρ^-] Verlust von mtDNA (Contamine & Picard, 2000; vgl. 3.1). Deshalb wurde im Folgenden das Vorhandensein der mtDNA untersucht. Um diese sichtbar zu machen, wurden DAPI-Färbungen mit anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Analysen vorgenommen.

In Wildtypzellen konnten hierbei neben dem Zellkern (Abb. 3-19; weißer Pfeil) jeweils 10-20 mtDNA-Nukleotide detektiert werden (Abb. 3-19; roter Pfeil). Auch Zellen der untersuchten Deletionsstämme wiesen ausschließlich (>95%) wildtypisch erscheinende mtDNA auf. Sowohl hinsichtlich der Form, als auch der Größe und Verteilung der Nukleotide konnten keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden (Abb. 3-19). Die beobachteten respiratorischen Defekte sind also nicht auf einen Verlust oder eine Verminderung der mtDNA zurückzuführen. Allenfalls partielle Schädigungen oder Mutationen könnten als Ursache auf mtDNA-Ebene noch vorliegen. Diese wären durch Kreuzungsexperimente mit *Δmip1* (*mitochondrial DNA-polymerase*)-Zellen erfassbar (siehe 3.1). Alternativ könnte auch eine mögliche Fehlstrukturierung der Innenmembran und speziell der Cristae die dort lokalisierte Atmungskette beeinträchtigen. Aussagen darüber sollten über elektronenmikroskopische Studien gewonnen werden.

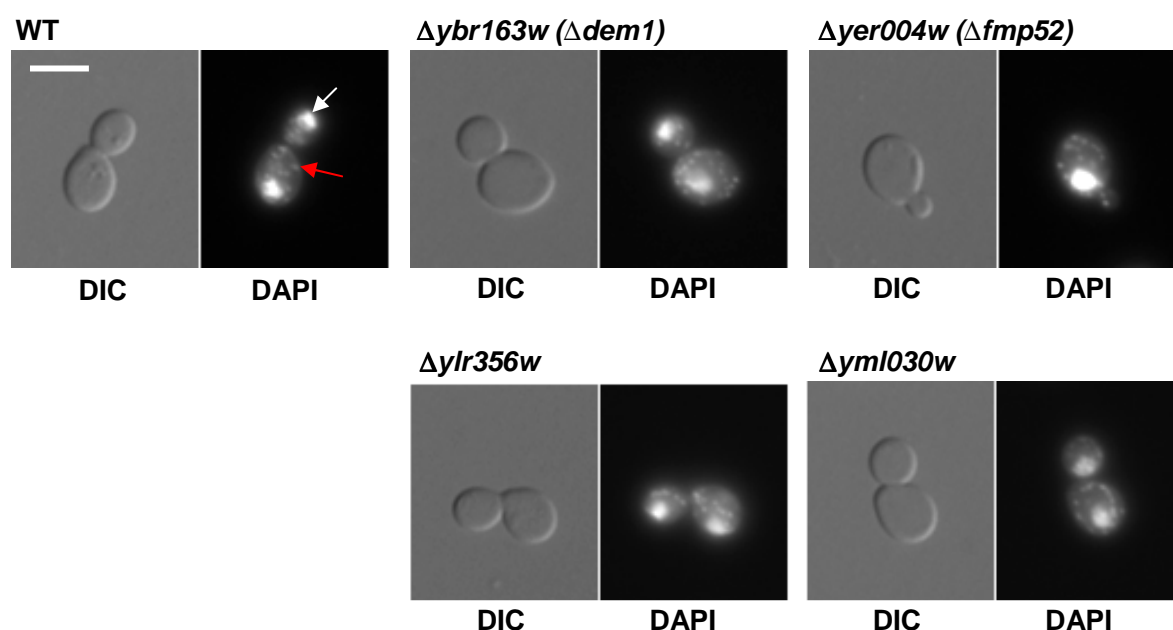


Abbildung 3-19: Alle Deletionsstämme besitzen wildtypisch strukturierte mtDNA. Zellen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und anschließend mit DAPI behandelt. Durch die Interkalation des Farbstoffs können das Kerngenom (weißer Pfeil) und die mtDNA-Nukleotide (roter Pfeil) fluoreszenzmikroskopisch erfasst werden. Zusätzlich zu den Fluoreszenzaufnahmen (DAPI) sind Differential-Interferenz-Kontrast-Aufnahmen (DIC) dargestellt. Der Größenbalken entspricht 5 µm. Alle mutanten Zellen besitzen ebenso wie der Vergleichswildtyp 10-20 Nukleotide.

3.2.2.4 Elektronenmikroskopische Erfassung der mitochondrialen Innenmembranstruktur ohne und mit Überexpression von *MDM33*

Neben der Klärung des respiratorischen Defekts existieren zwei weitere Indikationen, die elektronenmikroskopische Analysen notwendig machten. Zum einen liegen in den hohlkugel-

und ringähnlichen Mitochondrien von $\Delta mdm33$ -Zellen verlängerte Ausdehnungen der mitochondrialen Innen- und Außenmembran vor (Messerschmitt *et al.*, 2003). Diese ultrastrukturellen Besonderheiten könnten auch auftreten, wenn mögliche Mdm33-Wechselwirkungspartner fehlen. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten die identifizierten Deletionen alleine zwar keinerlei bzw. nur geringen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie, dennoch konnte damit nicht eindeutig ausgeschlossen werden, dass ultrastrukturelle Parallelen – eventuell in abgeschwächter Form – zum möglichen Wechselwirkungspartner vorliegen. Zum anderen führt die Überexpression von *MDM33* in Wildtypzellen zu veränderten Innenmembranstrukturen wie Septen oder Innenmembranvesikeln und zum Verlust der Cristae (Messerschmitt *et al.*, 2003). Bei einer durch Deletion des möglichen Wechselwirkungspartners blockierten Innenmembranteilung treten diese strukturellen Auffälligkeiten möglicherweise nicht oder nur in vermindertem Maße auf.

Für die Untersuchungen wurden Zellen der Deletionsstämme verwendet, die neben pYX223 bzw. pYX223-*GAL-MDM33* auch mit pVT100U-mtGFP transformiert waren. Aufgrund des eintretenden Wachstumsarrests bei Überexpression von *MDM33* war es nötig, die Zellen bis zur erforderlichen Zelldichte von $OD_{600} = \sim 1,0$ in SD-Medium anzuziehen und erst danach für die Induktion in SGal-Medium zu überführen. Die Kulturen wurden 8-10 h induziert und nach fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle des Phänotyps (Überexpressionsphänotyp in Wildtypzellen als Referenz) in Kunstharz eingebettet. Ultradünnschnitte wurden elektronenmikroskopisch untersucht (Abb. 3-20).

In Wildtypzellen mit dem leeren Kontrollplasmid waren die Mitochondrien über die gesamte Zelle verteilt (Abb. 3-20 A1) und wiesen reguläre Cristae- und Doppelmembranstrukturen auf (Abb. 3-20 A2 und 3; schwarze Pfeile). Auch in den untersuchten Deletionsstämmen mit Kontrollplasmid konnten keine aberranten Strukturen festgestellt werden. In allen Fällen lagen gleichmäßig verteilte Mitochondrien (exemplarisch für $\Delta ybr163w$ und $\Delta yml030w$ gezeigt; Abb. 3-20 C1 und G1) mit regelmäßigen Doppelmembranen und Cristae vor (Abb. 3-20 C2 und 3, E1 bis 3, F1 bis 3 und G2 bis 4). Bei Überexpression von *MDM33* entstanden in Mitochondrien von Wildtypzellen Septen und vesikuläre Innenmembraneinschlüsse (Abb. 3-20 B1 bis 3; rote und gelbe Pfeile). Auch in allen Deletionsmutanten kam es im gleichen Ausmaß zur Ausprägung dieses überexpressionsspezifischen Phänotyps. Exemplarisch sind für $\Delta ybr163w$ - und $\Delta yml030w$ -Zellen fehlstrukturierte Organellen mit mehrfachen Septen (rote Pfeile) gezeigt (Abb. 3-20 D1 bis 3 und H1 und 2).

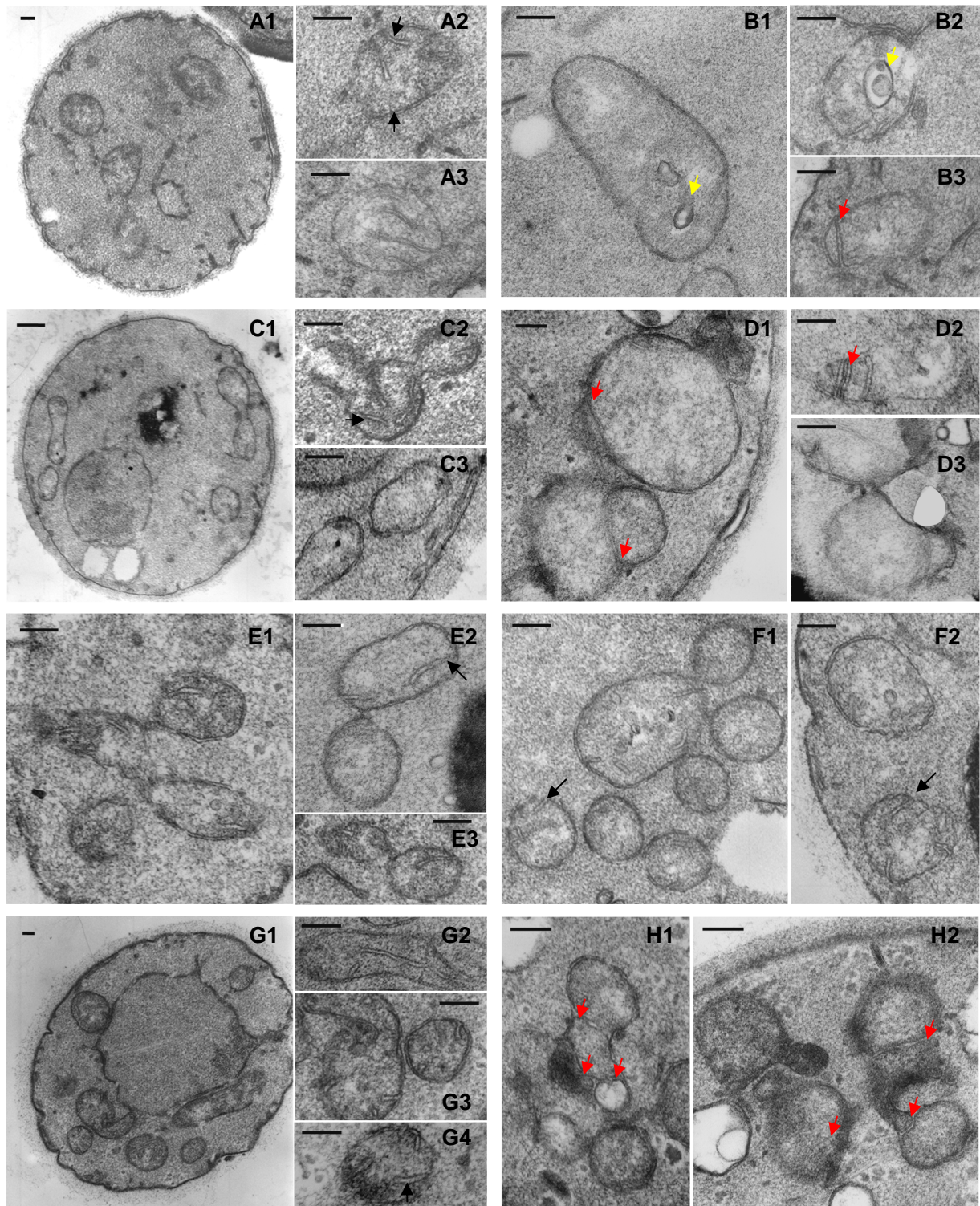


Abbildung 3-20: Die Mutanten verhalten sich vor und bei Überexpression von *MDM33* wie der Wildtyp. Hefezellen wurden bis zu einer OD_{600} von $\sim 1,0$ in SD-Medium angezogen und für die Induktion in SGal-Medium aufgenommen. Nach fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle des Phänotyps wurden die Zellen fixiert (Bauer *et al.*, 2001) und in Kunstharz eingebettet (Spurr, 1969). Ultradünnschnitte wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Vor Überexpression liegen gleichmäßig in der Zelle verteilte Mitochondrien mit Doppelmembran- und Cristaestrukturen vor (schwarze Pfeile). Bei Überexpression von *MDM33* bilden sich Innenmembranvesikel (gelbe Pfeile) und Septenstrukturen (rote Pfeile). **(A)** Wildtyp vor Überexpression. **(B)** Wildtyp bei Überexpression von *MDM33*. **(C)** $\Delta ybr163w$ ($\Delta dem1$) vor Überexpression. **(D)** $\Delta ybr163w$ ($\Delta dem1$) bei Überexpression von *MDM33*. **(E)** $\Delta yer004w$ ($\Delta fmp52$) vor Überexpression. **(F)** $\Delta ybr356w$ vor Überexpression. **(G)** $\Delta yml030w$ vor Überexpression. **(H)** $\Delta yml030w$ bei Überexpression von *MDM33*.

Sowohl vor als auch nach Überexpression von *MDM33* verhielten sich die Deletionsstämme ähnlich wie der Wildtyp. Die Gendeletionen alleine bewirkten keine Fehlstrukturierung der Innenmembran. Dies bestätigt die Befunde aus der Fluoreszenzmikroskopie, wo auch die äußere Struktur des Organells weitgehend unverändert war. Damit spielen die entsprechenden Proteine, anders als ihr möglicher Wechselwirkungspartner Mdm33, keine wichtige Rolle für die Innenmembran- und die allgemeine Mitochondrienmorphogenese. Allerdings ist es angesichts der Stringenz und Spezifität der vorliegenden Herangehensweise und der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unwahrscheinlich, dass die identifizierten Kandidaten funktionell nicht mit Mdm33 in Verbindung stehen. Möglicherweise handelt es sich bei den identifizierten Proteinen zwar um spezifische, aber untergeordnete regulatorische Faktoren der Innenmembranteilung. Berücksichtigt werden sollte auch, dass Deletionen von Morphologiekomponenten nicht automatisch die mitochondriale Struktur verändern. So sind wildtypische Netzwerke vorhanden, wenn die verifizierte Teilungskomponente Caf4 ausgeschaltet ist (Griffin *et al.*, 2005). In diesem Fall liegt sehr wahrscheinlich eine funktionelle Redundanz zu Mdv1 vor. Möglicherweise ist dies – trotz der unterschiedlichen Strukturen – auch für die detektierten Kandidatenproteine der Fall.

Zudem zeigten die Mitochondrien der Mutanten analog zum Wildtyp überexpressions-spezifische Innenmembransepten und -vesikel und verloren ihre Cristae. Der primäre Effekt der *MDM33*-Überexpression ist also nicht blockiert. Die Kompensation der fluoreszenzmikroskopisch erkennbaren mitochondrialen Fragmentierung und Aggregation bei Überexpression findet möglicherweise in einem späteren Schritt der Phänotypentwicklung statt. Die identifizierten Proteine könnten zum Beispiel als Adapter zwischen Innen- und Außenmembran fungieren und ihr Fehlen eine verschlechterte Koordination zwischen den Membranteilungsereignissen hervorrufen. Damit könnte eine übermäßige Mdm33-vermittelte Innenmembranteilung, die in Vesikeln und Septen resultiert, bis zu einem gewissen Grad ohne eine Veränderung der Gesamtorganellen erfolgen, was den fluoreszenzmikroskopisch sichtbaren Anteil an Wildtypmitochondrien in den Mutantenkulturen erklärt würde.

Die Tatsache, dass ausschließlich untergeordnete Faktoren identifiziert wurden, könnte ein Hinweis darauf sein, dass Mdm33 tatsächlich die Hauptkomponente der Innenmembranteilung darstellt und diesen Prozess relativ eigenständig vermittelt. Ein Argument hierfür wären die einzigartigen ring- und hohlkugelförmigen Mitochondrien der $\Delta mdm33$ -Deletionsmutante. In allen Bereichen der mitochondrialen Formgebung wurden bei Deletion der gleichberechtigten Hauptkomponenten der jeweiligen Prozesse einheitliche Phänotypen

beobachtet: Engmaschige mitochondriale Netze bei Störung der Teilung, Fragmente und Aggregate bei fehlender Fusionsfähigkeit und große Sphären im Fall eines Tubulationsdefekts (Zusammenfassung in Merz *et al.*, 2007). In genomweiten Screens nach sowohl nicht-essentiellen, als auch essentiellen Faktoren (Dimmer *et al.*, 2002; Altmann & Westermann, 2005), die die mitochondriale Morphologie beeinflussen, konnten keine Mutationen aufgedeckt werden, die gleichartige Strukturen wie $\Delta mdm33$ hervorbringen.

Eine umfassende Klärung, ob Mdm33 alleine wirkt oder Wechselwirkungspartner vorliegen ist unerlässlich für das Verständnis seiner Funktion und für das allgemeine Verständnis der mitochondrialen Teilung. Deshalb müssen in Zukunft weitere Versuche unternommen werden, um gleichberechtigte Interaktionspartner von Mdm33 zu finden oder definitiv auszuschließen. Auch die übrigen hier identifizierten, positiven Deletionsstämme aus den Wachstumsanalysen ($\Delta ydr061w$, $\Delta ygl080w$ und $\Delta ylr091w$) sollten funktionell weiter charakterisiert werden, um einen möglichen Zusammenhang der fehlenden Proteine mit der Innenmembranteilung zu erfassen.

3.2.3 Untersuchung des Einflusses von Mdm33 auf die mitochondriale Außenmembranteilungsmaschinerie

In Doppeldeletionsstudien wurde gezeigt, dass sich $\Delta mdm33$ epistatisch zu $\Delta fis1$ verhält, wobei *FIS1* eine Außenmembranteilungskomponente kodiert (Messerschmitt *et al.*, 2003). Das Ergebnis, dass ~50% der $\Delta mdv1$ -Zellen und sogar ~100% der $\Delta dnm1$ -Zellen bei Überexpression von *MDM33* tubuläre Mitochondrien besitzen, stellt eine weitere Beziehung zwischen der Mdm33-Funktion und der mitochondrialen Außenmembranteilung her (vgl. 3.2.1.2). Um deshalb den Einfluss von Mdm33 auf diesen Prozess näher zu untersuchen, wurde die Verteilung der Außenmembranteilungs-Schlüsselkomponente Dnm1 in der Deletionsmutante verfolgt. Dnm1 liegt als cytosolische Dimere vor (Ingerman *et al.*, 2005) und assoziiert an den Mitochondrien, wobei es über die Adapterproteine Mdv1/Caf4 und den Membrananker Fis1 gebunden wird (Übersicht in Okamoto & Shaw, 2005; Merz *et al.*, 2007; Westermann, 2008). Hier liegt es in punktförmigen Komplexen mehrerer Untereinheiten vor, die mittels GFP-Fusion fluoreszenzmikroskopisch sichtbar sind (Fekkes *et al.*, 2000; Mozdy *et al.*, 2000; Schauss *et al.*, 2006; vgl. auch Abb. 3-21). Zwischen den beiden Proteinpools an freiem und gebundenem Protein besteht ein Gleichgewicht von Mitochondrienassoziation und -dissoziation (Legesse-Miller *et al.*, 2003). Das Fehlen der Außenmembranteilungskomponenten Fis1, Mdv1 oder Caf4 beeinflusst dieses Dnm1-Gleichgewicht an der

Mitochondrienoberfläche (Mozdy *et al.*, 2000; Tieu & Nunnari, 2000; Griffin *et al.*, 2005; Schauss *et al.*, 2006). Mit Hilfe des Stamms $\Delta mdm33DNM1-GFP$, der neben der Gendeletion eine genomische GFP-Fusion an *DNM1* trägt, wurde untersucht, ob sich die Deletion von *MDM33* ebenfalls auf die mitochondriale Dnm1-GFP-Assemblierung auswirkt. Als Referenz wurde der entsprechende als „Wildtyp“ zu betrachtende Stamm WT(*DNM1-GFP*)⁴ verwendet. Die Zellen wurden auf YPD-, YPG- und YPGal-Medium angezogen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Parallel zur Mitochondrienmorphologie (Visualisierung mittels mtRFP) wurden Dnm1-GFP-Punkte quantifiziert.

3.2.3.1 Quantitative Erfassung der mitochondrialen Morphologie

Zunächst wurde die mitochondriale Morphologie der Zellen untersucht, um zum einen die Auswirkungen des GFP-tags an Dnm1 und zum anderen den Fitnesszustand der verwendeten Kulturen zu erfassen. Der als Kontrolle verwendete Stamm WT(*DNM1-GFP*) besaß auf allen Kohlenstoffquellen zum Großteil tubuläre, wildtypische Mitochondrien (Tab. 3-8), die auf YPGal und YPG aufgrund der metabolisch erforderlichen höheren Mitochondrienleistung stärker verzweigt waren (Abb. 3-21). Daneben waren vereinzelt (<3%) fragmentierte bis aggregierte Mitochondrien vorhanden. Dies entsprach in etwa den Ergebnissen für den GFP-freien Vergleichswildtyp. Die beobachteten Abweichungen von ~6-13% waren einem steigenden Anteil von $\Delta dnm1$ -spezifischen netzartigen Mitochondrien zuzuschreiben. In den entsprechenden Zellen war die mitochondriale Teilungsaktivität offenbar durch den GFP-tag beeinträchtigt. Da aber im Großteil der Zellen die Funktionalität des Dnm1-GFP-Fusionsprodukts vollständig erhalten war, konnte der WT(*DNM1-GFP*)-Stamm als wildtypisch behandelt werden.

In Zellen des $\Delta mdm33DNM1-GFP$ -Stamms waren auf allen Kohlenstoffquellen vorwiegend (79% bis 91,3%) ring- und lassoförmige Mitochondrien vorhanden, die auf YPD klein und auf YPGal und YPG groß ausgeprägt waren (Abb. 3-21). Auffällig war, dass in einigen der Ringe diffus fluoreszierende Innenbereiche vorlagen, bei denen es sich möglicherweise um dünn ausgezogene Matrixbereiche handeln könnte. Damit besteht eine Ähnlichkeit zu den netzartigen Strukturen, wie sie in Teilungsmutanten ($\Delta dnm1$, $\Delta fis1$, $\Delta mdv1$) auftreten. Alternativ könnten diese Strukturen auch Hohlkugeln darstellen. Mittels Epifluoreszenzmikroskop ist eine Unterscheidung jedoch nicht möglich. Deshalb wurden ergänzend konfokale Aufnahmen mit dem *laser scanning* Mikroskop Leica TCS-SP. Die

⁴ freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Stefan Jakobs (Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)

mtRFP-Fluoreszenz in der mitochondrialen Matrix (und die Dnm1-GFP-Fluoreszenz) konnte so in verschiedenen Zellebenen erfasst werden. Die fraglichen Strukturen wurden dadurch als hohlkugel- und schüsselförmige Mitochondrien identifiziert (Abb. A3 B und C). Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit den bereits publizierten Morphologiedaten der reinen Deletionsmutante überein (Messerschmitt *et al.*, 2003). Der zusätzliche GFP-tag an Dnm1 wirkt sich also auch in dieser Mutante nicht zusätzlich negativ aus.

Tabelle 3-8: Mitochondriale Morphologie von WT(*DNM1-GFP*)- und Δ *mdm33DNM1-GFP*-Zellen auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Stamm	mitochondriale Morphologie (Anteil der Zellen in %)								
	auf YPD			auf YPGal			auf YPG		
	tubulär	fragm.- aggr.	Netz	tubulär	fragm.- aggr.	Netz	tubulär	fragm.- aggr.	Netz
Vergleichs-WT	98,3 ± 0,5	1,7 ± 0,5	---	98,7 ± 1,2	1,3 ± 1,2	---	99,3 ± 0,5	0,7 ± 0,5	----
WT (<i>DNM1-GFP</i>)	92 ± 1,6	2 ± 0,8	6 ± 1,4	92 ± 0,8	1,7 ± 0,5	6,3 ± 0,5	83,9 ± 4,7	2,9 ± 0,9	13,2 ± 5,6
	tubulär	fragm.- aggr.	Ringe	tubulär	fragm.- aggr.	Ringe	tubulär	Netz	Ringe
Δ <i>mdm33</i> <i>DNM1-GFP</i>	11,2 ± 0,9	---	88,8 ± 0,9	6,7 ± 0,5	2 ± 1,4	91,3 ± 1,2	12 ± 1,6	9 ± 2,9	79 ± 1,4

mtRFP-exprimierende Zellen wurden über Nacht bei 30°C in YPD-, YPG- oder YPGal-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Angegeben sind Durchschnittswerte aus drei Auszählungen pro Nährmedium (jeweils n=100) mit Standardabweichung. Fragm.-aggr.: fragmentiert-aggregiert.

3.2.3.2 Quantifizierung von Dnm1-GFP-Punkten

Parallel zur Mitochondrienmorphologie wurden in den Hefekulturen die Dnm1-GFP-Punkte untersucht. Dabei wurden die Lokalisation (mitochondrial oder frei im Cytosol) und Größe, die Motilität und die Anzahl der Punkte beurteilt. Sowohl im Wildtyp als auch in der Deletionsmutante lagen diese unabhängig von der Kohlenstoffquelle fast ausschließlich assoziiert an den Mitochondrien vor (Abb. 3-21). Nur vereinzelt (in <2% der Zellen) waren cytosolische Punkte zu erkennen, die aber in beiden Stämmen gleich häufig auftraten. Auch die Größe und Beweglichkeit der Dnm1-GFP-Cluster war unabhängig von der Kohlenstoffquelle oder Mutation. In jeder untersuchten Kultur belief sich der Anteil an Zellen mit motilen Dnm1-GFP-Clustern auf etwa 15%. Die Bewegungen beschränkten sich auf ein „leichtes Wackeln“ an bzw. gerichtete Wanderung entlang der Mitochondrien.

Ein leichter Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante wurde bei der Quantifizierung der Dnm1-GFP-Cluster festgestellt: Δ *mdm33DNM1-GFP*-Zellen besaßen etwas weniger mitochondrial lokalisierte Cluster als Zellen des WT(*DNM1-GFP*)-Stamms.

Bei graphischer Auftragung der Dnm1-GFP-Cluster-Anzahl wurde für Zellen des Deletionsstamms eine negative Verschiebung der Verteilung deutlich (Abb. 3-22). Während der Großteil der Wildtypzellen auf YPD-Medium zwischen acht und zehn Dnm1-GFP-Cluster aufwies, waren in mutanten Zellen meist sechs bis sieben Proteinassoziate zu erkennen. Im Durchschnitt verringerte sich die Anzahl um zwei Dnm1-GFP-Cluster von 9,8 auf 7,8 (Tab. 3-9). Bei Anzucht auf YPGal- und YPG-Medium war die gleiche Tendenz zu beobachten. Einziger Unterschied zum YPD-Experiment waren die aufgrund der größeren Mitochondrienmasse auf diesen Kohlenstoffquellen höheren Haupt- und Durchschnittswerte der Cluster-Anzahl (11,8 und 11,2 für den WT bzw. 9,4 und 9,2 für die Mutante). Eine leichte Abweichung zwischen WT und Mutante wurde also auf allen Kohlenstoffquellen erfasst.

Tabelle 3-9: Gesamtdurchschnitte an Dnm1-GFP-Punkten pro Mutterzelle.

Stamm	Gesamtdurchschnitt an Dnm1-GFP-Punkten in Mutterzellen		
	auf YPD	auf YPGal	auf YPG
WT (<i>DNM1-GFP</i>)	9,8	11,8	11,2
Δ <i>mdm33</i> <i>x</i> <i>DNM1-GFP</i>	7,8	9,4	9,2

Der jeweilige Gesamtdurchschnitt ergab sich aus den drei Auszählungen pro Kohlenstoffquelle (n=300) (vgl. Abb. 3-22).

Mdm33 ist nicht essentiell für die Assemblierung von Dnm1-GFP an der Mitochondrienoberfläche. Die Anzahl der Proteincluster sinkt jedoch um durchschnittlich 20%. Dies ist eine konstante Auswirkung, die unabhängig von der Kohlenstoffquelle in gleichem Maße eintritt. Hierfür sind grundsätzlich direkte und indirekte Ursachen denkbar. Zum einen könnte ausschließlich die ungünstige Form der Mitochondrien (Hohlkugeln oder Schüsseln) eine Ausbildung von Dnm1-Komplexen erschweren. Ähnliche sterische Effekte wurden für die großen, sphärischen Mitochondrien der Δ *mdm10*-Mutante⁵ beobachtet, wo eine reduzierte Dnm-GFP-Clusteranzahl mitochondrial vorlag (Otsuga *et al.*, 1998). Allerdings trat die reduzierte Dnm-GFP-Assemblierung auch an ring- und lassoähnlichen Mitochondrien ohne diffus fluoreszierende Innenbereiche auf. Hier sind Tubuli normalen Durchmessers vorhanden, an denen – zumindest aus sterischer Sicht – eine wildtypische Dnm1-GFP-Assemblierung möglich sein sollte. Somit ist eine direkte Auswirkung der Deletion wahrscheinlicher.

⁵ Mdm10: *mitochondrial distribution and morphology*; Komponente der mitochondrialen Tubulation mit zusätzlicher Beteiligung am mitochondrialen Import (Meisinger *et al.*, 2004).

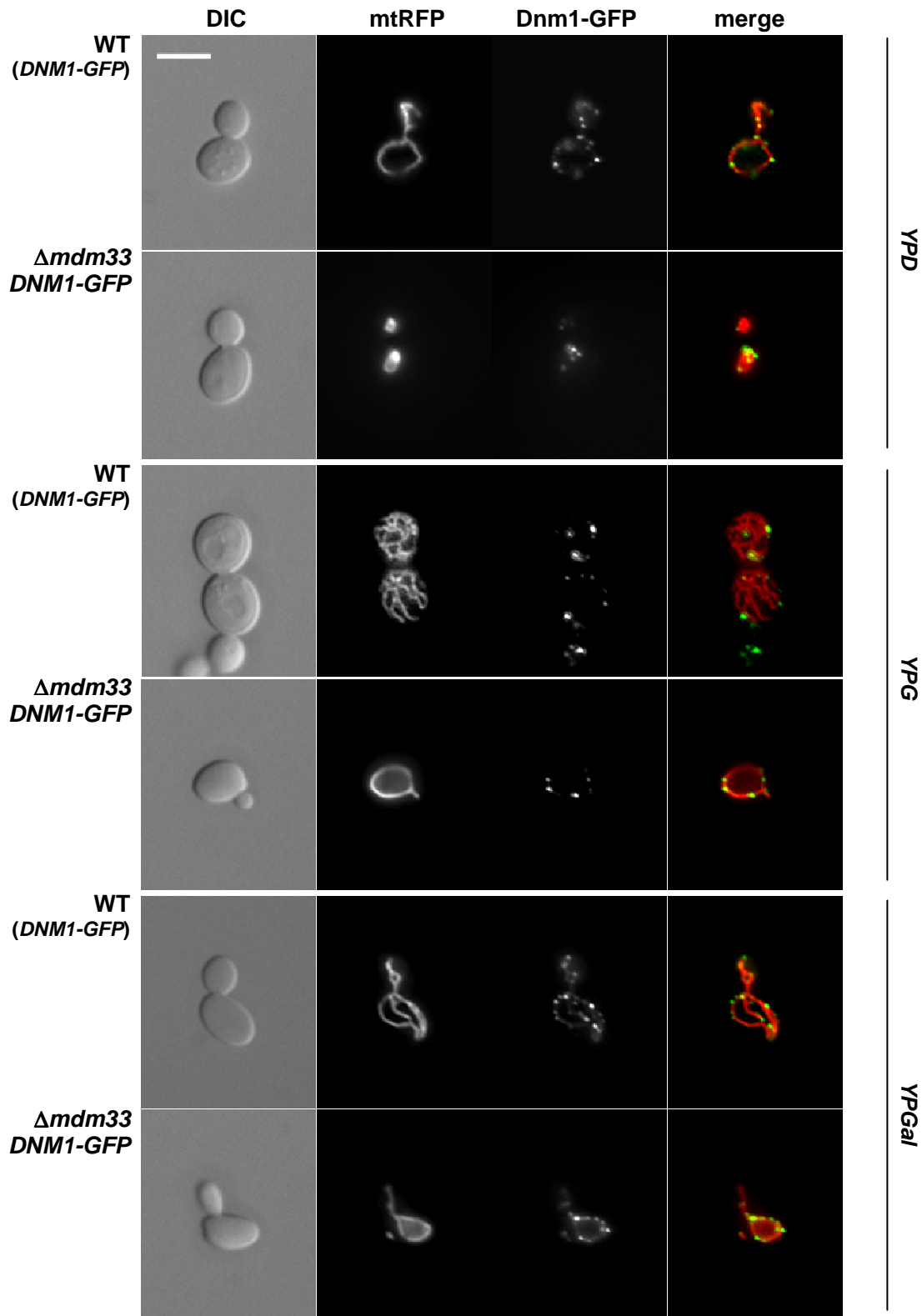


Abbildung 3-21: Mitochondriale Morphologie und Lokalisation von Dnm1-GFP-Punkten in Wildtyp- und Δ *mdm33*-Zellen. Zellen wurden über Nacht bei 30°C in YPD-, YPG- oder YPGal-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Jede Bilderserie besteht aus einer Differential-Interferenz-Kontrast-Aufnahme (DIC), jeweils einer Fluoreszenzaufnahme der mtRFP-gefärbten Mitochondrien (mtRFP) und der Dnm1-GFP-Punkte (Dnm1-GFP) sowie einer Überlagerung der beiden Fluoreszenzaufnahmen (merge). Der Größenbalken entspricht 5 μ m. Wildtypzellen enthalten tubuläre Mitochondrien, Organellen der Δ *mdm33*-Mutante sind ringförmig. Die Dnm1-GFP-Cluster sind unabhängig von der Kohlenstoffquelle sowohl in WT- als auch in Δ *mdm33*-Zellen zumeist (>98%) mitochondrial lokalisiert.

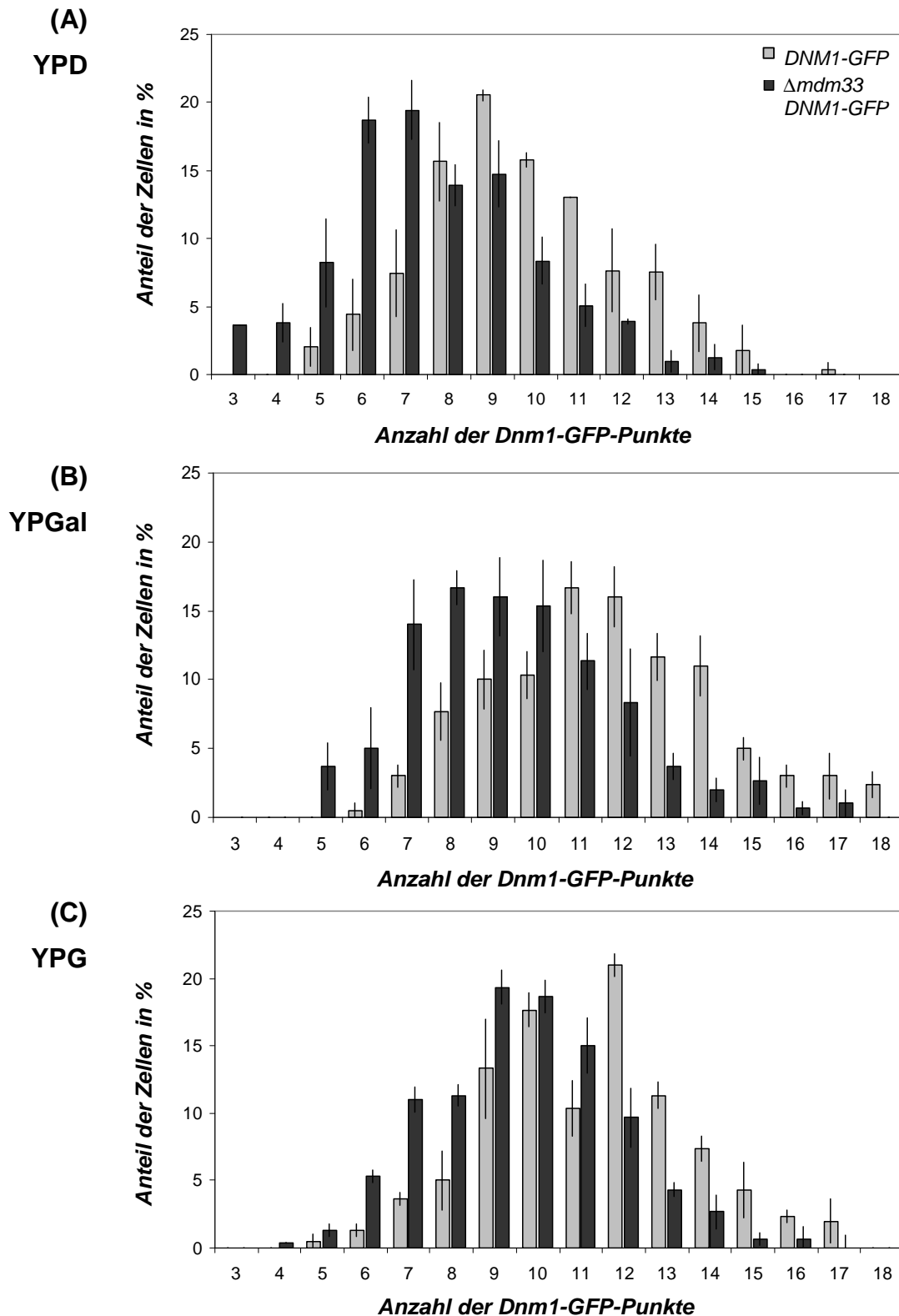


Abbildung 3-22: Die Deletion von *MDM33* führt zu einer leichten Reduktion der Dnm1-GFP-Cluster-Anzahl. Für eine Quantifizierung der Dnm1-GFP-Cluster an den Mitochondrien wurden die Zellen über Nacht bei 30°C in flüssigem YPD-, YPGal- oder YPG-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Es wurden stets die in den Mutterzellen liegenden Punkte ausgezählt. Angegeben sind Durchschnittswerte aus drei Auszählungen pro Nährmedium (jeweils n=100) mit Standardabweichungen.

Die Ergebnisse könnten damit zum anderen als Bestätigung des bestehenden Mdm33-Wirkmodells gewertet werden. Dieses schlägt vor, dass Mdm33 auf entgegengesetzten Seiten der mitochondrialen Innenmembran über homotypische Wechselwirkungen im Matrixraum die Einschnürungen von Mitochondrientubuli (= *Constrictions*) und/oder die vollständige Innenmembranteilung hervorruft (Messerschmitt *et al.*, 2003). Laut Legesse-Miller *et al.* (2003) sind solche *Constrictions* die Voraussetzung für mitochondriale Teilungsereignisse. Sie konnten zeigen, dass an Mitochondrien in zwei voneinander unabhängigen Prozessen ständig Einschnürungen des Mitochondrientubulus entstehen und Dnm1-Cluster assemblieren. Nur dann aber, wenn Einschnürung und Assemblierung gleichzeitig erfolgen, kommt es tatsächlich zur Bildung mitochondrienumschließender Dnm1-GFP-Spiralen und zur Teilung. In den meisten Fällen lösen sich die Cluster wieder auf, bevor sie neu entstehen (Legesse-Miller *et al.*, 2003). Da in Δmdm33 -Zellen gemäß dem Wirkmodell keine *Constrictions* bzw. Innenmembranteilungsereignisse möglich sind, sollten nur unproduktive Dnm1-GFP-Assemblierungen gebildet werden. Interessanterweise haben in Teilungsereignisse involvierte Dnm1-Cluster eine längere Verweildauer an den Mitochondrien (30-90 s) als davon unabhängige (Legesse-Miller *et al.*, 2003). Berücksichtigt man die längere Verweildauer und die Tatsache, dass bis zu 2,5 Teilungen pro Minute und Zelle stattfinden (Nunnari *et al.*, 1997; Jakobs *et al.*, 2003b), so könnte die hier beobachtete Reduktion um durchschnittlich zwei Cluster tatsächlich das Fehlen der teilungsinvolvierten Dnm1-Spiralen widerspiegeln. Auch das Fehlen von freien Schlauchenden in Δmdm33 -Zellen, die als Teilungsendprodukte entstehen, stimmt mit einer fehlenden Teilungsaktivität und der Hypothese überein, dass der Mdm33-spezifische Phänotyp durch eine reduzierte Teilungsaktivität bei gleichzeitig fortschreitender dreidimensionaler Fusion zustande kommt (Messerschmitt *et al.*, 2003).

4 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Die Voraussetzung, um Prozesse zu verstehen, die grundlegend für die Funktion und die Vererbung von Organellen sind, ist die Identifizierung und Charakterisierung der involvierten molekularen Komponenten (Dimmer *et al.*, 2002). Im postgenomischen Zeitalter stellen Deletionsbibliotheken dafür ein wertvolles Hilfsmittel dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ausgehend von der ~4800 Deletionsmutanten nicht-essentieller Hefegene umfassenden *MAT α* -Deletionsbibliothek Screens durchgeführt, um das Verständnis zweier wichtiger Teilbereiche der mitochondrialen Biogenese zu verbessern, dem Erhalt der Atmungsfähigkeit und der mitochondrialen Teilung als zentraler Bestandteil der Morphogenese.

4.1 Genetische Basis von respiratorischem Wachstum, mitochondrialem Genom-Erhalt und mitochondrialer Proteinsynthese in *Saccharomyces cerevisiae*

4.1.1 Identifizierung und Charakterisierung von Mutanten mit Wachstumsdefekt auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle

Um Gene zu finden, die für die respiratorische Kompetenz in Hefe benötigt werden, wurde die gesamte *MAT α* -Deletionsbibliothek (BioCat, Heidelberg; Giaever *et al.*, 2002; Kastenmayer *et al.*, 2006) (~4800 Stämme) nach Mutanten mit letalem Wachstumsdefekt auf glyzerinhaltigem Medium (YPG) durchsucht (=pet-Stämme). Dadurch wurden insgesamt 319 pet-Stämme identifiziert, wobei eine deutliche Korrelation zwischen pet-Phänotyp und mitochondrialer Lokalisation der fehlenden Genprodukte besteht, die die biologische Relevanz widerspiegelt. Die ermittelten pet-Gene wurden mit bestehenden Datensätzen nach Dimmer *et al.* (2002) und Luban *et al.* (2005) verglichen und anhand weiterer Experimente funktionell gruppiert. Diese weiterführenden Analysen gaben Aufschluss über die Funktionen der jeweils deletierten Gene. Mittels Cytofluoreszenz, ergänzenden DAPI-Färbungen und Komplementationstest wurde der Status der mtDNA erfasst. Die radioaktive Markierung mitochondrialer Translationsprodukte ermöglichte zudem eine selektive Analyse der Proteinexpression des Organells und zusätzliche Adaptionsversuche lieferten Informationen über den Einfluss der Katabolitrepression.

Die vergleichenden Gendeletionsanalysen ermöglichten durch stringente Kriterien einen definierten Satz an 163 proteinkodierenden Genen zu ermitteln, die obligat für den respiratorischen Metabolismus in Hefe benötigt werden. Darunter waren auch zehn weitgehend uncharakterisierte Gene, die *RRG1* bis *RRG10* genannt wurden. Diese Daten können als Positivliste an Genen dienen, die für respiratorisches Wachstum, den Erhalt mitochondrialer DNA und mitochondrialer Proteinsynthese benötigt werden. Es muss jedoch betont werden, dass einige Komponenten fehlen könnten, die durch redundante Gene kodiert werden oder deren Deletionsstämme in der Bibliothek fehlerhaft waren. Außerdem könnten einige Gene speziell für andere respiratorische Kohlenstoffquellen als Glycerin (z. B. für Laktat oder Ethanol) oder in bestimmten genetischen Stammbhintergründen benötigt werden.

Durch die vergleichenden Analysen wurden einige Deletionen gefunden, die in verschiedenen Versionen der Bibliotheken unterschiedliche Phänotypen erzeugten (*pet* und nicht-*pet*). PCR-Analysen machten deutlich, dass diese Unterschiede nicht alleine auf falsche Stämme zurückzuführen sind, sondern dass vielmehr eine Plastizität des *pet*-Phänotyps zugrunde liegt. Zwei weitere Beobachtungen untermauern, dass diese phänotypische Plastizität viel größer ist, als bisher angenommen: Zum einen kann die respiratorische Inkompetenz durch ein Aufheben der Katabolitrepression revertiert werden, und zum anderen ist eine Anzahl von [*rho*⁺] Stämmen durch Cytoduktion rettbar. Es ist eine Herausforderung in Zukunft den Beitrag von Umweltfaktoren, Nährstoffversorgung, Alterung und mögliche epigenetische Faktoren auf die phänotypische Plastizität zu untersuchen.

Die funktionelle Gruppierung der *pet*-Mutanten identifizierte 16 Gene, die für den Erhalt der mtDNA, und 98 Gene, die für die mitochondriale Proteinsynthese erforderlich sind (88 für die allgemeine und zehn für die Translation spezifischer Produkte). In jeder Kategorie wurden mehrere, jeweils schon bekannte Komponenten dieser Prozesse erfasst, was die Aussagekraft der Ergebnisse demonstriert.

Die Studien zum mtDNA-Erhalt verdeutlichen erneut den von Myers *et al.* (1985) beschriebenen Einfluss der Proteinsynthese auf den mtDNA-Erhalt. Auf bisher unbekannte Art und Weise führt eine Blockierung der mitochondrialen Genexpression zum Verlust der mtDNA. Ein besonders interessanter Kandidat unter den Faktoren, die für den mtDNA-Erhalt benötigt werden, ist Rrg5. Dieses Protein ist weitgehend uncharakterisiert und wurde erst kürzlich mit dem mitochondrialen Lipidstoffwechsel in Verbindung gebracht. Bei Deletion von *RRG5* sinken die Cardiolipin- und Phosphatidylethanolamin-Konzentrationen der

mitochondrialen Membranen (Osman *et al.*, 2009). Wie genau sich ein veränderter Lipidhaushalt auf den Erhalt der mtDNA auswirkt, muss zukünftig untersucht werden.

Die durchgeführten Analysen zeigen darüber hinaus, dass mtDNA auch spontan verloren werden kann und viele Faktoren nur indirekt am Erhalt der respiratorischen Aktivität beteiligt sind. 44 Mutanten, die nach mehreren Generationen auf fermentierbarer Kohlenstoffquelle keine mtDNA mehr besaßen, konnten nach der Cytoduktion ihre mtDNA stabil erhalten. Die Tatsache, dass 77% dieser Stämme nicht in den Datensätzen von Dimmer *et al.* (2002) und Luban *et al.* (2005) enthalten waren, zeigt eine Möglichkeit auf, wie die beobachtete phänotypische Plastizität zustande kommen kann.

Von den 98 Genen, die essentiell für die mitochondriale Proteinsynthese sind, kodieren 88 für Komponenten, die für die allgemeine mitochondriale Translation benötigt werden. In Übereinstimmung mit ihrer Funktion wurden innerhalb dieser Gruppe hauptsächlich mitochondriale Ribosomenuntereinheiten, mitochondriale Transkriptions- und Translationsfaktoren sowie mitochondriale tRNA-Synthetasen identifiziert. Darüber hinaus wurden aber auch unbekannte Proteine, z. B. Rrg1, Rrg2, Rrg6 und Rrg8, erfasst. Durch Datenbankrecherchen und strukturelle Eigenschaften lassen sich für Rrg2 und Rrg6 direkte Zusammenhänge mit der mitochondrialen Proteinexpression herstellen. So besitzt das Protein Rrg2 ein Pentatricopeptid-Motiv (PPR-Motiv). Proteine, die ein solches Motiv tragen, sind zumeist in Plastiden und Mitochondrien lokalisiert, wo sie an verschiedenen Punkten der Genexpressionskontrolle beteiligt sind (Andrés *et al.*, 2007). Das Protein Rrg6 zeigt hohe Homologien zur bakteriellen Glutamyl-tRNA-Amidotransferase, die für die prä-translationale Aminosäuremodifikation essentiell ist (Oshikane *et al.*, 2006). Für Rrg1 und Rrg8 sind anhand von Proteinsequenzen oder Homologien keinerlei Anhaltspunkte vorhanden. Für alle vier Proteine wird es in Zukunft wichtig sein, ihre Funktion bei der mitochondrialen Translation herauszuarbeiten.

Die verbleibenden zehn essentiellen Faktoren der mitochondrialen Proteinexpression sind für die Synthese spezifischer mitochondrialer Genprodukte verantwortlich. Für sechs Komponenten, spezifische Translations- und Splicingfaktoren, war dies bereits beschrieben. Darüber hinaus wurden vier Proteine erstmals mit der mitochondrialen Proteinexpression in Verbindung gebracht. Besonders interessant ist dieser neue Zusammenhang für Cyc3 und Rrg10. Cyc3 ist die mitochondriale Cytochrom *c* Häm-Lyase, die im Intermembranraum den Häm-Kofaktor an Apo-Cytochrom *c* bindet (Dumont *et al.*, 1987). In der Deletionsmutante wurde eine starke Reduktion an Cox1 sowie Cytochrom *b* und eine zusätzliche Proteinbande

unbekannter Identität oberhalb von Cox3 beobachtet. Cyc3 könnte also auch für die Biogenese anderer mitochondrialer Proteine von Bedeutung sein. Als weiterer Schritt wäre es sinnvoll, die Identität der zusätzlichen Bande zu klären, indem das Protein z. B. aus dem Gel extrahiert und über Massenspektrometrie/Sequenzierung identifiziert wird. Dadurch wären weitere Informationen über die Funktion von Cyc3 bei der mitochondrialen Proteinexpression möglich. Bei Rrg10 handelt es sich um ein bisher uncharakterisiertes mitochondriales Protein von nur 85 Aminosäuren, das möglicherweise eine spezifische Rolle in der Expression oder Assemblierung des mitochondrialen *COX1*-Genprodukts spielt. Interessanterweise besitzt dieses Protein gemäß Vorhersage eine Transmembrandomäne (Hofmann & Stoffel, 1993). Die Membraninsertion hydrophober, mitochondrial synthetisierter Proteinen, wie Cox1, wird co-translational durch Oxa1 vermittelt (Mokranjac & Neupert, 2009). Wie diese Prozesse in Membrannähe koordiniert werden, ist bisher nicht voll verstanden. Falls Rrg10 direkt an der Transkription, der Reifung der mRNA und/oder der Translation von Cox1 beteiligt ist, so könnte seine Membranverankerung ein Hinweis sein, wie Proteinsynthese und Membraninsertion gekoppelt werden.

Im Rahmen der funktionellen Gruppierung wurden als eine weitere Gruppe Gene erfasst, die die respiratorische Kompetenz unabhängig von mtDNA-Erhalt und mitochondrialer Proteinexpression beeinflussen. Viele davon stehen in Verbindung zur Vakuolenfunktion. Außerdem sind viele Gene, die für V-ATPase Untereinheiten kodieren, hoch penetrant. Diese Befunde spiegeln eine wichtige, bisher noch nicht voll verstandene funktionelle Beziehung zwischen Mitochondrien und Vakuolen wider. Vakuoläre Fehlfunktionen führen unter anderem zu einer gestörten Ionen- und pH-Homöostase (Klionsky *et al.*, 1990; Kane, 2006), können Zellen hypersensitiv gegenüber oxidativem Stress machen (Thorpe *et al.*, 2004; Kane, 2007; Milgrom *et al.*, 2007) und beeinträchtigen den Autophagiestoffwechsel, über den auch Mitochondrien abgebaut werden (Kissova *et al.*, 2007). Durch alle drei Prozesse wird die mitochondriale Funktion beeinflusst. Zukünftig sollte speziell die Rolle der Vakuole in der mitochondrialen Qualitätskontrolle und im mitochondrialen *turnover* ausführlich untersucht werden.

Besonders interessant wird als nächster Schritt die Funktionsanalyse der bisher uncharakterisierten, für die respiratorische Kompetenz essentiellen Proteine Rrg1 bis 10. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erste Anhaltspunkte erarbeitet, an welchen Prozessen diese Proteine beteiligt sein könnten. Die Klärung ihrer genauen Funktionen und

ein umfassendes mechanistisches Verständnis der molekularen Prozesse, die zur respiratorischen Aktivität beitragen, erfordern noch weitere entscheidende Experimente. Die hier gezeigte systematische, funktionelle *large-scale* Analyse der *pet*-Mutanten stellt allerdings einen ersten Schritt zur Erfassung der vollen Anzahl an Genen dar, die für den Erhalt der mtDNA und der mtTranslation benötigt werden. Zusammen mit umfassenden genomischen und proteomischen Herangehensweisen (Prokisch *et al.*, 2004) und bestehenden Protein-Interaktionsnetzwerken (Perocchi *et al.*, 2006) wird es dazu beitragen, das System Mitochondrion mit ständig zunehmender Auflösung zu verstehen.

4.1.2 Der *pet*-Phänotyp in den COX-Assemblierungs-Mutanten Δcox10 , Δcox16 , Δcox19 und Δmss2

Als besonders interessante Gruppe wurden 23 *pet*-Mutanten identifiziert, deren respiratorische Inkompetenz sowohl durch Kreuzung mit Δmip1 als auch durch Cytoduktion revertiert wurde. Diese Mutanten besitzen gemäß Kreuzung mit Δmip1 ein mitochondriales [*rho*⁺]-Genom und können nach Erhalt von frischem cytosolischem Material durch Cytoduktion wieder Atmung betreiben. Die respiratorische Kompetenz hängt in diesen Mutanten also möglicherweise nicht ausschließlich vom mitochondrialen oder vom Kerngenom ab, sondern wird zusätzlich von extragenomischen Faktoren bestimmt. Unter den 23 Stämmen waren auch vier Cytochrom *c* Oxidase (COX)-Assemblierungsfaktoren, die weiter untersucht wurden. Durch plasmidale Komplementation konnten irreversible Schäden der Mitochondrien aufgedeckt werden, deren Entstehung während des logarithmischen Wachstums induziert und während chronologischer Alterung stark beschleunigt wurde. Diese Schädigungen waren primär auf mtDNA-Ebene zu beobachten, betrafen aber auch andere Makromoleküle, wie möglicherweise Lipide oder Proteine. Als wahrscheinliche Ursache dieser Schäden wurde eine verstärkte Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) identifiziert.

Zusammenfassend entstand folgendes Bild der Phänotypentstehung der COX-Assemblierungs-Mutanten: Primäre Ursache der beobachteten respiratorischen Inkompetenz in den Mutanten Δcox10 , Δcox16 , Δcox19 und Δmss2 ist die Fehlfunktion der Cytochrom *c* Oxidase, die den Elektronentransport in der Atmungskette stört. Dadurch entstehen sekundär vermehrt ROS. Parallel beeinträchtigt der durch den respiratorischen Defekt bestehende Energiemangel möglicherweise den ROS-Abbau. So kommt es zu einer verstärkten ROS-Akkumulation, die gravierende zelluläre Schädigungen hervorruft.

In Zukunft sollten weitere Experimente durchgeführt werden, um die Art der Schäden und speziell den Beitrag verschiedener Prozesse zur ROS-Akkumulation zu erfassen. Für die

gezielte Analyse mtDNA-unabhängiger Schäden wurden Stämme mit selektierbarer mtDNA hergestellt. Diese könnten in Zukunft eingesetzt werden, um Mutanten mit anderweitiger Schädigung anzureichern und über direkte Nachweisverfahren die modifizierten Lipide oder Proteine zu charakterisieren. Eine Untersuchung des Wachstums der Mutanten auf H₂O₂-haltigem Medium ermöglicht, die Empfindlichkeit gegenüber ROS zu testen. Dadurch könnten Informationen über eine möglicherweise reduzierte Entgiftungsrate gewonnen werden, die weiterführend in direkten Messungen der Superoxiddismutase-, Catalase- und Peroxidase-Aktivität der Mutanten quantitativ erfassbar wäre. Interessant wäre auch die Durchführung von Microarrayanalysen, mit denen Veränderungen im Expressionsmuster sichtbar wären, wie sie für [*rho*⁰]-Zellen bereits gezeigt wurden (Epstein *et al.*, 2001). Die COX-Assemblierungs-Mutanten könnten dadurch als Modellsystem für die atemungskettenabhängige ROS-Produktion dienen.

4.2 Studien zur mitochondrialen Morphogenese

4.2.1 Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von Wechselwirkungspartnern der mitochondrialen Innenmembranteilungskomponente Mdm33

Die mitochondriale Dynamik wird durch ständige Fusions- und Teilungsereignisse bestimmt. Die intensive Forschung der letzten Jahre, speziell am Modellorganismus *S. cerevisiae*, entschlüsselte die entscheidenden Komponenten dieser Prozesse (Zusammenfassung in: Merz *et al.*, 2007; Westermann, 2008). Im Fall der Fusion wurden zwei koordiniert arbeitende Maschinerien in der Außen- und Innenmembran identifiziert (Hoppins *et al.*, 2007). Im Fall der Teilung ist bisher ausschließlich die Maschinerie der Außenmembranteilung charakterisiert. Dennoch gibt es bereits Anhaltspunkte, die auf eine separat ablaufende Innenmembranteilung hindeuten. Beispielsweise schreitet in *C. elegans* die Innenmembranteilung weiter voran, wenn die Außenmembranteilung durch Verlust der Drp1-Funktion blockiert ist (Labrousse *et al.*, 1999). Durch Messerschmitt *et al.* (2003) schließlich konnte mit Mdm33 eine mögliche Komponente der mitochondrialen Innenmembranteilung in Hefe identifiziert werden. Über genetische Wechselwirkung sollten im Rahmen dieser Arbeit Interaktionspartner dieser Komponente gefunden werden. Das Verfahren beruhte dabei auf der Überexpression von *MDM33* in Hefedeletionsmutanten, die in Wildtypzellen zu einem Wachstumsarrest und einer Zerstörung des mitochondrialen Netzwerks führt (Messerschmitt *et al.*, 2003). Aufgrund einer unterbrochenen Wirkkaskade sollte bei Fehlen eines

Wechselwirkungspartners durch Gendeletion dieser negative Überexpressionseffekt auf das Wachstum und/oder die Mitochondrienmorphologie eliminiert werden. Deshalb wurden diese beiden Parameter in einer Vorauswahl von 164 Deletionsmutanten untersucht, in denen vor allem mitochondriale Proteine mit unbekannter Funktion fehlen.

Die Suche nach genetischen Wechselwirkungspartnern der Innenmembranteilungskomponente Mdm33 lieferte als vielversprechende Kandidaten insgesamt sieben bisher uncharakterisierte Proteine. Darüber hinaus wurden die Deletionsstämme $\Delta dnm1$ und $\Delta mdv1$, denen Komponenten der mitochondrialen Außenmembranteilungsmaschinerie fehlen, als überexpressionstolerant erfasst. Durch Doppeldeletionsanalysen war bereits im Vorfeld eine funktionelle Beziehung zwischen der Mdm33-Wirkung und der Außenmembranteilung bekannt (Messerschmitt *et al.*, 2003). Die Detektion von $\Delta dnm1$ und $\Delta mdv1$ beweist deshalb die Spezifität des vorgenommenen genetischen Screens, und die überschaubare Anzahl an identifizierten Kandidaten die Stringenz. Vier der sieben bisher uncharakterisierten Deletionsstämme konnten durch eine weiterführende funktionelle Charakterisierung als wahrscheinlich untergeordnete, regulatorische Komponenten der Innenmembranteilung eingestuft werden. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen und die EM-Experimente lieferten keinen Hinweis auf eine wichtige Rolle in diesem Prozess, da sowohl die äußere Gestalt, als auch die Innenmembran im Deletionsfall weitgehend wildtypisch strukturiert war. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass Mdm33 tatsächlich die Hauptkomponente der Innenmembranteilung darstellt und diesen Prozess relativ eigenständig vermittelt. Übereinstimmend dazu weist die $\Delta mdm33$ -Deletionsmutante einen ring- und hohlkugelähnlichen mitochondrialen Phänotyp auf, der bisher in keiner anderen Mutante beobachtet werden konnte. In genomweiten Screeningverfahren mit Mutanten essentieller und nicht-essentieller Gene wurden keine vergleichbaren mitochondrialen Strukturen entdeckt (Dimmer *et al.*, 2002; Altmann & Westermann, 2005).

Allerdings sind auch andere Gründe für eine mangelnde Detektion gleichberechtigter Wechselwirkungspartner denkbar. (1) Zum einen interagiert Mdm33 möglicherweise – in Analogie zu Caf4 und Mdv1 in der Außenmembranteilungsmaschinerie – mit redundanten Komponenten. Dadurch könnte bei Einzeldelation der jeweils andere Partner die Mdm33-vermittelte Überexpression ermöglichen. Entsprechende Kandidaten würden durch die vorliegende Herangehensweise nicht erfasst. (2) Unter Umständen liegt das Problem in der Vorauswahl der Stämme. Aufgrund der zeitaufwändigen Transformationsprozedur konnte nur eine begrenzte Anzahl an Deletionsmutanten (164) berücksichtigt werden. Im

mitochondrialen Proteom sind aber ~1000 Proteine enthalten. Hier wurden zunächst vor allem Mutanten untersucht, in denen Gene deletiert sind, die für bisher uncharakterisierte Proteine mit wahrscheinlich mitochondrialer Lokalisation kodieren. Vor allem bereits funktionell charakterisierte mitochondriale Komponenten wurden nicht berücksichtigt. Allerdings könnten auch Proteine mit dualen Funktionen bei der Innenmembranteilung eine Rolle spielen. Deshalb wäre es sinnvoll, die Überexpressionsstudien zumindest auf alle nicht-essentiellen mitochondrialen Proteine auszuweiten. (3) Problematisch ist außerdem, dass durch das gewählte *GAL*-Überexpressionssystem eine Anzucht auf Minimalselektivmedium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle erfolgen muss. Im Laufe des Screens zeigte sich jedoch, dass einige Stämme bereits mediumsbedingte Wachstumsdefekte erleiden, aufgrund des dadurch hervorgerufenen verfrühten Übergangs in die stationäre Wachstumsphase fragmentierte oder aggregierte Mitochondrien ausbilden und deshalb nicht hinsichtlich einer überexpressionsbedingten Fragmentierung/Aggregation der Mitochondrien untersucht werden können. Die grundsätzliche genetische Herangehensweise, die Mdm33-Funktion durch das Fehlen wechselwirkender Faktoren stark zu beeinträchtigen oder sogar auszuschalten, ist jedoch sinnvoll. Deshalb wäre es eventuell ratsam, mit einem anderen induzierbaren System zu arbeiten. In Zusammenarbeit mit Tobias Reichenbach (Universität Bayreuth, Institut für Zellbiologie; Diplomarbeit 2008) wurde deshalb ein funktionelles Plasmid mit Cu^{2+} -induzierbarem *MDM33* hergestellt, das in weiteren Studien Anwendung finden könnte.

Eine umfassende Klärung, ob Mdm33 alleine wirkt oder essentielle Wechselwirkungspartner vorliegen, ist unerlässlich für das Verständnis seiner Funktion und für das allgemeine Verständnis der mitochondrialen Teilung. Deshalb müssen in Zukunft weitere Versuche unternommen werden, um gleichberechtigte Interaktionspartner von Mdm33 zu finden oder definitiv auszuschließen. Zum einen sollten die diskutierten Verbesserungsvorschläge vorgenommen werden, um weitere genetische Interaktionen zu erfassen. Zum anderen sollten alternative Strategien verfolgt werden. Eine Möglichkeit wären Two-Hybrid-Analysen, mit denen auch spezifische Wechselwirkungen verschiedener Mdm33-Domänen erfasst werden könnten. Darüber hinaus bieten sich Pulldown-Experimente mit anschließender Massenspektrometrie an, um die genaue Zusammensetzung des hochmolekularen Mdm33-Komplexes (Messerschmitt *et al.*, 2003) zu entschlüsseln.

4.2.2 Der Einfluss von Mdm33 auf die mitochondriale Außenmembranteilungsmaschinerie

Die Außenmembranteilungsmaschinerie in Hefe besteht aus den vier Proteinen Fis1, Mdv1, Caf4 und Dnm1. Dabei wirkt Fis1 als mitochondrialer Membrananker, die Orthologen Mdv1 und Caf4 als Adapter und Dnm1 als die Teilungsschlüsselkomponente, die durch Bildung von Spiralen die Abschnürung des Mitochondrientubulus bewerkstelligt.

Im Rahmen des *MDM33*-Überexpressionsscreens wurden die teilungsdefizienten Mutanten $\Delta mdv1$ und $\Delta dnm1$ als überexpressionstolerant identifiziert. 50% bzw. 100% der Zellen mit Deletion von *MDVI* bzw. *DNMI* waren in der Lage, die überexpressionsbedingte Fragmentierung/Aggregation der Mitochondrien zu kompensieren und wiesen tubuläre Strukturen auf. Die Entstehung des fluoreszenzmikroskopisch sichtbaren Überexpressionsphänotyps kann also durch eine Blockierung der Außenmembranteilungsmaschinerie verhindert werden. Daraus lässt sich schließen, dass die überexpressionsbedingte äußere Fragmentierung/Aggregation der Mitochondrien durch eine verstärkte Aktivität der Teilungsmaschinerie entsteht. Die bei Überexpression vermehrte Mdm33-Funktion zieht also vermehrte Außenmembranteilung nach sich, was das Modell einer Wirkung von Mdm33 *upstream* der Außenmembranteilungsmaschinerie (Messerschmitt *et al.*, 2003) bestätigt. Wenn mehr Mdm33 mehr Teilung bedeutet, dann sollte auch der Umkehrschluss gültig sein, d. h. bei Deletion sollte eine verringerte Aktivität vorliegen. Indirekt ist das ein weiteres Indiz dafür, dass die ring- und hohlkugelförmigen Mitochondrien der $\Delta mdm33$ -Deletionsmutante – wie von Messerschmitt *et al.* (2003) vorgeschlagen – tatsächlich durch eine reduzierte Teilungsaktivität bei voranschreitender Fusion entstehen.

Mdm33 moduliert also die Teilungsaktivität der Mitochondrien. Grundsätzlich sind zwei Möglichkeiten denkbar, wie eine veränderte Teilungsrate erreicht wird: (1) veränderte mitochondriale Assemblierung der Teilungsschlüsselkomponente Dnm1 oder (2) veränderte Aktivierung der assemblierten Teilungskomplexe. Um diese beiden Fälle zu unterscheiden, wurde durch eine Auszählung von Dnm1-GFP-Clustern die mitochondriale Assemblierung von Außenmembranteilungsmaschinerie-Komplexen verfolgt. Für den Überexpressionsfall war dies jedoch problematisch, da der Phänotyp mit dem verwendeten *GAL*-System sprunghaft und ohne Zwischenstufen entsteht. Dadurch können ausschließlich die mitochondrialen Fragmente/Aggregate als Endpunkt der Phänotypentwicklung analysiert werden, wobei in diesem Stadium die Reaktion bereits abgeschlossen ist. Deshalb wurde wiederum eine Übertragung auf den stabileren Deletionzustand vorgenommen, in dem vermutlich eine verringerte Teilungsaktivität vorliegt. Die Quantifizierung der mitochondrial

lokalisierten Dnm1-GFP-Cluster in der Deletionsmutante zeigte, dass kein großer Einfluss auf die Assemblierung besteht. Im Vergleich zum Wildtyp waren nur 20% weniger Dnm1-Cluster an den Mitochondrien vorhanden, was unabhängig von der Kohlenstoffquellen war. Die Deletion beeinflusst also nicht primär die Assemblierung der Teilungsmaschinerie, sondern möglicherweise *post-targeting* die Ausbildung teilungsaktiver Komplexe. Nach heutigem Wissenstand ist für eine Aktivierung zum einen die Tätigkeit von Mdv1 (Naylor *et al.*, 2006) und zum anderen die Ausbildung von Tubuluseinschnürungen (*Constrictions*) nötig (Legesse-Miller *et al.*, 2003). Eine Beteiligung von Mdm33 an der Bildung von *Constrictions* würde dem bestehenden Mdm33-Wirkmodell entsprechen. Dieses geht davon aus, dass Mdm33 über homotypische Wechselwirkungen seiner matrixständigen Coiled-coil-Domänen α -helikale Bündel ausbildet und dadurch entgegengesetzte Innenmembranbereiche in räumlich Nähe bringt, wodurch eine Einschnürung des Tubulus erfolgt und eine Fusion der Innenmembranen (= *de facto* Teilung) möglich wird.

Im Rahmen der Arbeit wurden also zusätzliche Anhaltspunkte für das bestehende Wirkmodell von Mdm33 während der mitochondrialen Teilung gefunden. Es sind jedoch noch weitere Schritte erforderlich, um die Funktion von Mdm33 endgültig zu klären. Sinnvoll wäre zum Beispiel *time-lapse* Fluoreszenzmikroskopie in Kombination mit *3D image reconstruction* (analog Legesse-Miller *et al.*, 2003). Dadurch könnte zum einen untersucht werden, ob in der Δ *mdm33*-Deletionsmutante noch *Constrictions* gebildet werden (vollständige Innenmembranteilungsereignisse können über Fluoreszenzmikroskopie nicht aufgelöst werden). Ist dies nicht der Fall, wäre ein direkter Beweis für die Beteiligung von Mdm33 an diesem Prozess erbracht. Unter Verwendung einer Mutante mit reprimierbarer *MDM33*-Expression (z. B. durch Doxycyclin) könnte dieser Prozess nicht nur am Endpunkt der Phänotypentstehung, sondern auch in deren Verlauf erfasst werden. Zum anderen könnte mit dieser Mutante parallel die Entstehung des mitochondrialen Δ *mdm33*-Phänotyps verfolgt werden. Dadurch wären Zwischenschritte erkennbar, die möglicherweise weitere Aussagen über die mechanistischen Grundlagen liefern würden. Auch eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Deletionsstämme Δ *mdv1* und Δ *dnm1* bei Überexpression von *MDM33* könnte hilfreiche Aussagen liefern. In den $\geq 50\%$ verbleibenden tubulären Strukturen sollte die Ausbildung von Septen und Vesikeln verfolgt werden. Sind nach wie vor diese Mdm33-vermittelten Strukturen vorhanden, wäre damit der Beweis einer Außenmembranteilungsmaschinerie-unabhängig fortschreitenden Innenmembranteilung erbracht. Durch Kombination mit Immunogold-Markierung könnte Mdm33 möglicherweise

an den Septen lokalisiert werden, um die spezifische Proteinfunktion innerhalb dieses Prozesses zu beweisen. Diese und weitere Experimente könnten zukünftig helfen, die mechanistischen Details der Mdm33-Funktion herauszuarbeiten, und letztendlich das Modell der mitochondrialen Teilung zu komplettieren.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Ackerman, S.H., Gatti, D.L., Gellefors, P., Douglas, M.G. und Tzagoloff, A. (1991). *ATP13*, a nuclear gene of *Saccharomyces cerevisiae* essential for the expression of subunit 9 of the mitochondrial ATPase. *FEBS Lett* 278, 234-238.
- Adams, K.L. und Palmer, J.D. (2003). Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol Phylogenet Evol* 29, 380-395.
- Altmann, K. und Westermann, B. (2005). Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 16, 5410-5417.
- Andrés, C., Lurin, C. und Small, I.D. (2007). The multifarious roles of PPR proteins in plant mitochondrial gene expression. *Physiol Plant* 129, 14-22.
- Alvaro, D., Lisby, M. und Rothstein, R. (2007). Genome-wide analysis of Rad52 foci reveals diverse mechanisms impacting recombination. *PLoS Genet* 3, e228.
- Attardi, G. und Schatz, G. (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 4, 289-333.
- Balaban, R.S., Nemoto, S. und Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.
- Bandy, B. und Davison, A.J. (1990). Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radic Biol Med* 8, 523-539.
- Barros, M.H., Netto, L.E. und Kowaltowski, A.J. (2003). H₂O₂ generation in *Saccharomyces cerevisiae* respiratory *pet* mutants: effect of cytochrome *c*. *Free Radic Biol Med* 35, 179-188.
- Bauer, B.E., Wolfger, H. und Kuchler, K. (1999). Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461, 217-236.
- Bauer, C., Herzog, V. und Bauer, M.F. (2001). Improved Technique for Electron Microscope Visualization of Yeast Membrane Structure. *Microsc Microanal* 7, 530-534.
- Bereiter-Hahn, J. (1990). Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol* 122, 1-63.
- Berger, K.H., Sogo, L.F. und Yaffe, M.P. (1997). Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. *J Cell Biol* 136, 545-553.
- Bhar, D., Karren, M.A., Babst, M. und Shaw, J.M. (2006). Dimeric Dnm1-G385D interacts with Mdv1 on mitochondria and can be stimulated to assemble into fission complexes containing Mdv1 and Fis1. *J Biol Chem* 281, 17312-17320.
- Birnboim, H.C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 100, 243-255.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J. und Shaw, J.M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol* 1, 298-304.
- Boldogh, I.R., Nowakowski, D.W., Yang, H.C., Chung, H., Karmon, S., Royes, P. und Pon, L.A. (2003). A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Mol Biol Cell* 14, 4618-4627.
- Bonawitz, N.D., Rodeheffer, M.S. und Shadel, G.S. (2006). Defective mitochondrial gene expression results in reactive oxygen species-mediated inhibition of respiration and reduction of yeast life span. *Mol Cell Biol* 26, 4818-4829.
- Boveris, A. und Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134, 707-716.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. und Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115-132.
- Broadley, S.A., Demlow, C.M. und Fox, T.D. (2001). Peripheral mitochondrial inner membrane protein, Mss2p, required for export of the mitochondrially coded Cox2p C tail in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21, 7663-7672.
- Burgess, S.M., Delannoy, M. und Jensen, R.E. (1994). *MMM1* encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J Cell Biol* 126, 1375-1391.

- Burke, D., Dawson, D. und Stearns, T. (2000) Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Butow, R.A. und Avadhani, N.G. (2004). Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell* 14, 1-15.
- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E. und Ros, J. (2000). Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275, 27393-27398.
- Carlson, C.G., Barrientos, A., Tzagoloff, A. und Glerum, D.M. (2003). COX16 encodes a novel protein required for the assembly of cytochrome oxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278, 3770-3775.
- Carroll, C.W. und Morgan, D.O. (2002). The Doc1 subunit is a processivity factor for the anaphase-promoting complex. *Nat Cell Biol* 4, 880-887.
- Cervený, K.L., McCaffery, J.M. und Jensen, R.E. (2001). Division of mitochondria requires a novel DMN1-interacting protein, Net2p. *Mol Biol Cell* 12, 309-321.
- Chan, D.C. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125, 1241-1252.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E. und Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160, 189-200.
- Chen, X.J., Wang, X., Kaufman, B.A. und Butow, R.A. (2005). Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science* 307, 714-717.
- Claros, M.G. und Vincens, P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* 241, 779-786.
- Contamine, V. und Picard, M. (2000). Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 281-315.
- Costanzo, M.C. und Fox, T.D. (1986). Product of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene *PET494* activates translation of a specific mitochondrial mRNA. *Mol Cell Biol* 6, 3694-3703.
- Costanzo, M.C., Seaver, E.C. und Fox, T.D. (1989). The *PET54* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of a nuclear gene encoding a mitochondrial translational activator and subcellular localization of its product. *Genetics* 122, 297-305.
- Davidson, J.F. und Schiestl, R.H. (2001). Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21, 8483-8489.
- Dimmer, K.S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W. und Westermann, B. (2002). Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13, 847-853.
- Dimmer, K.S., Jakobs, S., Vogel, F., Altmann, K. und Westermann, B. (2005). Mdm31 and Mdm32 are inner membrane proteins required for maintenance of mitochondrial shape and stability of mitochondrial DNA nucleoids in yeast. *J Cell Biol* 168, 103-115.
- Dumont, M.E., Ernst, J.F., Hampsey, D.M. und Sherman, F. (1987). Identification and sequence of the gene encoding cytochrome c heme lyase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 6, 235-241.
- Duvezin-Caubet, S., Rak, M., Lefebvre-Legendre, L., Tetaud, E., Bonnefoy, N. und di Rago, J.P. (2006). A "petite obligate" mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: functional mtDNA is lethal in cells lacking the delta subunit of mitochondrial F₁-ATPase. *J Biol Chem* 281, 16305-16313.
- Egner, A., Jakobs, S. und Hell, S.W. (2002). Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3370-3375.
- Ephrussi, B., Hottinguer, H. und Tavlitzi, J. (1949). Action de l'acriflavine sur les levures II. Étude génétique du mutant "petite colonie". *Ann Inst Pasteur* 76, 419-442.
- Epstein, C.B., Waddle, J.A., Hale, W.t., Dave, V., Thornton, J., Macatee, T.L., Garner, H.R. und Butow, R.A. (2001). Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol Biol Cell* 12, 297-308.
- Espinete, C., de la Torre, M.A., Aldea, M. und Herrero, E. (1995). An efficient method to isolate yeast genes causing overexpression-mediated growth arrest. *Yeast* 11, 25-32.
- Fang, J. und Beattie, D.S. (2003). External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide. *Free Radic Biol Med* 34, 478-488.

- Federovitch, C.M., Jones, Y.Z., Tong, A.H., Boone, C., Prinz, W.A. und Hampton, R.Y. (2008). Genetic and structural analysis of Hmg2p-induced endoplasmic reticulum remodeling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 19, 4506-4520.
- Fekkes, P., Shepard, K.A. und Yaffe, M.P. (2000). Gag3p, an outer membrane protein required for fission of mitochondrial tubules. *J Cell Biol* 151, 333-340.
- Finn, R.D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P.C., Sammut, S.J., Hotz, H.R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S.R., Sonnhammer, E.L., *et al.* (2008). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 36, D281-288.
- Foury, F. (1989). Cloning and sequencing of the nuclear gene *MIP1* encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem* 264, 20552-20560.
- Foury, F. und Kucej, M. (2002). Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr Opin Chem Biol* 6, 106-111.
- Frey, T.G. und Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 25, 319-324.
- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W. und Westermann, B. (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J Cell Biol* 152, 683-692.
- Fritz, S., Weinbach, N. und Westermann, B. (2003). Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast. *Mol Biol Cell* 14, 2303-2313.
- Fukushima, N.H., Brisch, E., Keegan, B.R., Bleazard, W. und Shaw, J.M. (2001). The GTPase effector domain sequence of the Dnm1p GTPase regulates self-assembly and controls a rate-limiting step in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell* 12, 2756-2766.
- Gancedo, J.M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 334-361.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., *et al.* (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418, 387-391.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., *et al.* (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563-547.
- Graham, L.A., Hill, K.J. und Stevens, T.H. (1995). *VMA8* encodes a 32-kDa V1 subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar H⁺-ATPase required for function and assembly of the enzyme complex. *J Biol Chem* 270, 15037-15044.
- Grant, C.M., MacIver, F.H. und Dawes, I.W. (1997). Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 410, 219-222.
- Gray, M.W., Burger, G. und Lang, B.F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481.
- Gray, M.W., Burger, G. und Lang, B.F. (2001). The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol* 2, REVIEWS1018.
- Gray, M.W. und Doolittle, W.F. (1982). Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol Rev* 46, 1-42.
- Green, D.R. und Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Griffin, E.E., Graumann, J. und Chan, D.C. (2005). The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J Cell Biol* 170, 237-248.
- Griffin, E.E., Detmer, S.A. und Chan, D.C. (2006). Molecular mechanism of mitochondrial membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* 1763, 482-489.
- Grivell, L.A. (1995). Nucleo-mitochondrial interactions in mitochondrial gene expression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30, 121-164.
- Grivell, L.A., Artal-Sanz, M., Hakkaart, G., de Jong, L., Nijtmans, L.G., van Oosterum, K., Siep, M. und van der Spek, H. (1999). Mitochondrial assembly in yeast. *FEBS Lett* 452, 57-60.
- Güldener, U., Münsterkotter, M., Kastenmüller, G., Strack, N., van Helden, J., Lemer, C., Richelles, J., Wodak, S.J., Garcia-Martinez, J., Perez-Ortín, J.E., *et al.* (2005). CYGD: the Comprehensive Yeast Genome Database. *Nucleic Acids Res* 33, D364-368.
- Hales, K.G. und Fuller, M.T. (1997). Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 90, 121-129.
- Herlan, M., Vogel, F., Bornhøvd, C., Neupert, W. und Reichert, A.S. (2003). Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 278, 27781-27788.

- Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J. und Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol* 143, 359-373.
- Herrero, E., Ros, J., Belli, G. und Cabiscol, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 1780, 1217-1235.
- Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 52, 536-553.
- Hiona, A. und Leeuwenburgh, C. (2008). The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging. *Exp Gerontol* 43, 24-33.
- Hobbs, A.E., Srinivasan, M., McCaffery, J.M. und Jensen, R.E. (2001). Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *J Cell Biol* 152, 401-410.
- Hoffmann, H.P. und Avers, C.J. (1973). Mitochondrion of yeast: ultrastructural evidence for one giant, branched organelle per cell. *Science* 181, 749-751.
- Hofmann, K. und Stoffel, W. (1993). TMbase - A database of membrane spanning protein segments. *Biol Chem. Hoppe-Seyler* 347, 166.
- Hoppins, S., Lackner, L. und Nunnari, J. (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76, 751-780.
- Hoppins, S., Horner, J., Song, C., McCaffery, J.M. und Nunnari, J. (2009). Mitochondrial outer and inner membrane fusion requires a modified carrier protein. *J Cell Biol* 184, 569-581.
- Hoye, A.T., Davoren, J.E., Wipf, P., Fink, M.P. und Kagan, V.E. (2008). Targeting mitochondria. *Acc Chem Res* 41, 87-97.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S. und O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.
- Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E. und Nunnari, J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* 170, 1021-1027.
- Issel-Tarver, L., Christie, K.R., Dolinski, K., Andrada, R., Balakrishnan, R., Ball, C.A., Binkley, G., Dong, S., Dwight, S.S., Fisk, D.G., *et al.* (2002). *Saccharomyces* Genome Database. *Methods Enzymol* 350, 329-346.
- Jakobs, S., Martini, N., Schauss, A.C., Egner, A., Westermann, B. und Hell, S.W. (2003a). Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *J Cell Sci* 116, 2005-2014.
- Jakobs, S., Schauss, A.C. und Hell, S.W. (2003b). Photoconversion of matrix targeted GFP enables analysis of continuity and intermixing of the mitochondrial lumen. *FEBS Lett* 554, 194-200.
- Jamieson, D.J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1511-1527.
- Johnson, W.T. und DeMars, L.C. (2004). Increased heme oxygenase-1 expression during copper deficiency in rats results from increased mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *J Nutr* 134, 1328-1333.
- Johnston, M. (1999). Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet* 15, 29-33.
- Jones, B.A. und Fangman, W.L. (1992). Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev* 6, 380-389.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D.W. und Wood, P.M. (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim Biophys Acta* 1504, 179-195.
- Kaeberlein, M., Burtner, C.R. und Kennedy, B.K. (2007). Recent developments in yeast aging. *PLoS Genet* 3, e84.
- Kane, P.M. (2006). The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 177-191.
- Kane, P.M. (2007). The long physiological reach of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 39, 415-421.
- Kassir, Y., Adir, N., Boger-Nadjar, E., Raviv, N.G., Rubin-Bejerano, I., Sagee, S. und Shenhar, G. (2003). Transcriptional regulation of meiosis in budding yeast. *Int Rev Cytol* 224, 111-171.

- Kastenmayer, J.P., Ni, L., Chu, A., Kitchen, L.E., Au, W.C., Yang, H., Carter, C.D., Wheeler, D., Davis, R.W., Boeke, J.D., *et al.* (2006). Functional genomics of genes with small open reading frames (sORFs) in *S. cerevisiae*. *Genome Res* 16, 365-373.
- Kelly, D.P. und Scarpulla, R.C. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* 18, 357-368.
- Kissova, I., Salin, B., Schaeffer, J., Bhatia, S., Manon, S. und Camougrand, N. (2007). Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy* 3, 329-336.
- Klionsky, D.J., Herman, P.K. und Emr, S.D. (1990). The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol Rev* 54, 266-292.
- Kreike, J., Schulze, M., Pillar, T., Korte, A. und Rödel, G. (1986). Cloning of a nuclear gene *MRS1* involved in the excision of a single group I intron (bl3) from the mitochondrial *COB* transcript in *S. cerevisiae*. *Curr Genet* 11, 185-191.
- Kucej, M. und Butow, R.A. (2007). Evolutionary tinkering with mitochondrial nucleoids. *Trends Cell Biol* 17, 586-592.
- Labrousse, A.M., Zappaterra, M.D., Rube, D.A. und van der Bliek, A.M. (1999). *C. elegans* dynamin-related protein *DRP-1* controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell* 4, 815-826.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lahaye, A., Stahl, H., Thines-Sempoux, D. und Foury, F. (1991). *PIF1*: a DNA helicase in yeast mitochondria. *EMBO J* 10, 997-1007.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Larsson, C., Pahlman, I.L., Ansell, R., Rigoulet, M., Adler, L. und Gustafsson, L. (1998). The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 347-357.
- Lecrenier, N. und Foury, F. (2000). New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man. *Gene* 246, 37-48.
- Legesse-Miller, A., Massol, R.H. und Kirchhausen, T. (2003). Constriction and Dnm1p recruitment are distinct processes in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell* 14, 1953-1963.
- Lettier, G., Feng, Q., de Mayolo, A.A., Erdeniz, N., Reid, R.J., Lisby, M., Mortensen, U.H. und Rothstein, R. (2006). The role of DNA double-strand breaks in spontaneous homologous recombination in *S. cerevisiae*. *PLoS Genet* 2, e194.
- Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y. und Sheng, M. (2004). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119, 873-887.
- Lill, R. und Mühlenhoff, U. (2005). Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 30, 133-141.
- Ling, F. und Shibata, T. (2002). Recombination-dependent mtDNA partitioning: in vivo role of Mhr1p to promote pairing of homologous DNA. *EMBO J* 21, 4730-4740.
- Liu, Z. und Butow, R.A. (1999). A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Mol Cell Biol* 19, 6720-6728.
- Luban, C., Beutel, M., Stahl, U. und Schmidt, U. (2005). Systematic screening of nuclear encoded proteins involved in the splicing metabolism of group II introns in yeast mitochondria. *Gene* 354, 72-79.
- Lupas, A., Van Dyke, M. und Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252, 1162-1164.
- Mannella, C.A. (2008). Structural diversity of mitochondria: functional implications. *Ann N Y Acad Sci* 1147, 171-179.
- Marbois, B., Gin, P., Faull, K.F., Poon, W.W., Lee, P.T., Strahan, J., Shepherd, J.N. und Clarke, C.F. (2005). Coq3 and Coq4 define a polypeptide complex in yeast mitochondria for the biosynthesis of coenzyme Q. *J Biol Chem* 280, 20231-20238.
- Marres, C.A., de Vries, S. und Grivell, L.A. (1991). Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 195, 857-862.

- Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. und Estruch, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* 15, 2227-2235.
- McQuibban, G.A., Saurya, S. und Freeman, M. (2003). Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* 423, 537-541.
- Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J.M. und Nunnari, J. (2006). Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* 127, 383-395.
- Meeusen, S., McCaffery, J.M. und Nunnari, J. (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 305, 1747-1752.
- Meeusen, S., Tieu, Q., Wong, E., Weiss, E., Schieltz, D., Yates, J.R. und Nunnari, J. (1999). Mgm101p is a novel component of the mitochondrial nucleoid that binds DNA and is required for the repair of oxidatively damaged mitochondrial DNA. *J Cell Biol* 145, 291-304.
- Meisinger, C., Risser, M., Chacinska, A., Szklarz, L.K., Milenkovic, D., Kozjak, V., Schönfisch, B., Lohaus, C., Meyer, H.E., Yaffe, M.P., et al. (2004) The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *Dev Cell* 7, 61-71.
- Meissner, C. (2007). Mutations of mitochondrial DNA – cause or consequence of the ageing process? *Z Gerontol Geriat*, 40, 325-333.
- Merz, S., Hammermeister, M., Altmann, K., Durr, M. und Westermann, B. (2007). Molecular machinery of mitochondrial dynamics in yeast. *Biol Chem* 388, 917-926.
- Merz, S. und Westermann, B. (2009). Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol* 10, R95.
- Messerschmitt, M., Jakobs, S., Vogel, F., Fritz, S., Dimmer, K.S., Neupert, W. und Westermann, B. (2003). The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol* 160, 553-564.
- Milgrom, E., Diab, H., Middleton, F. und Kane, P.M. (2007). Loss of vacuolar proton-translocating ATPase activity in yeast results in chronic oxidative stress. *J Biol Chem* 282, 7125-7136.
- Mokranjac, D. und Neupert, W. (2009) Thirty years of protein translocation into mitochondria: unexpectedly complex and still puzzling. *Biochim Biophys Acta* 1793, 33-41.
- Morris, T.W., Reed, K.E. und Cronan, J.E., Jr. (1994). Identification of the gene encoding lipote-protein ligase A of *Escherichia coli*. Molecular cloning and characterization of the lplA gene and gene product. *J Biol Chem* 269, 16091-16100.
- Mozdy, A.D., McCaffery, J.M. und Shaw, J.M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* 151, 367-380.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Myers, A.M., Pape, L.K. und Tzagoloff, A. (1985). Mitochondrial protein synthesis is required for maintenance of intact mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 4, 2087-2092.
- Nass, M.M. und Nass, S. (1963). Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. I. Fixation and Electron Staining Reactions. *J Cell Biol* 19, 593-611.
- Naylor, K., Ingerman, E., Okreglak, V., Marino, M., Hinshaw, J.E. und Nunnari, J. (2006). Mdv1 interacts with assembled dnm1 to promote mitochondrial division. *J Biol Chem* 281, 2177-2183.
- Nobrega, M.P., Nobrega, F.G. und Tzagoloff, A. (1990). COX10 codes for a protein homologous to the ORF1 product of *Paracoccus denitrificans* and is required for the synthesis of yeast cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 265, 14220-14226.
- Nobrega, M.P., Bandeira, S.C., Beers, J. und Tzagoloff, A. (2002). Characterization of COX19, a widely distributed gene required for expression of mitochondrial cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 277, 40206-40211.
- Nunnari, J., Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J.W. und Walter, P. (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell* 8, 1233-1242.

- Okamoto, K. und Shaw, J.M. (2005). Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* 39, 503-536.
- Osman, C., Haag, M., Potting, C., Rodenfels, J., Dip, P.V., Wieland, F.T., Brugger, B., Westermann, B. und Langer, T. (2009). The genetic interactome of prohibitins: coordinated control of cardiolipin and phosphatidylethanolamine by conserved regulators in mitochondria. *J Cell Biol* 184, 583-596.
- Oshikane, H., Sheppard, K., Fukai, S., Nakamura, Y., Ishitani, R., Numata, T., Sherrer, R.L., Feng, L., Schmitt, E., Panvert, M., *et al.* (2006). Structural basis of RNA-dependent recruitment of glutamine to the genetic code. *Science* 312, 1950-1954.
- Otsuga, D., Keegan, B.R., Brisch, E., Thatcher, J.W., Hermann, G.J., Bleazard, W. und Shaw, J.M. (1998). The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol* 143, 333-349.
- Overkamp, K.M., Bakker, B.M., Kotter, P., van Tuijl, A., de Vries, S., van Dijken, J.P. und Pronk, J.T. (2000). In vivo analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J Bacteriol* 182, 2823-2830.
- Palade, G.E. (1952). The fine structure of mitochondria. *Anat Rec* 114, 427-451.
- Paul, M.F., Velours, J., Arselin de Chateaubodeau, G., Aigle, M. und Guerin, B. (1989). The role of subunit 4, a nuclear-encoded protein of the F₀ sector of yeast mitochondrial ATP synthase, in the assembly of the whole complex. *Eur J Biochem* 185, 163-171.
- Paul, M.F., Ackerman, S., Yue, J., Arselin, G., Velours, J., Tzagolof, A. und Ackermann, S. (1994). Cloning of the yeast *ATP3* gene coding for the gamma-subunit of F₁ and characterization of *atp3* mutants. *J Biol Chem* 269, 26158-26164.
- Perez-Martinez, X., Broadley, S.A. und Fox, T.D. (2003). Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J* 22, 5951-5961.
- Perfettini, J.L., Roumier, T. und Kroemer, G. (2005). Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol* 15, 179-183.
- Perkins, G.A., Renken, C.W., Song, J.Y., Frey, T.G., Young, S.J., Lamont, S., Martone, M.E., Lindsey, S. und Ellisman, M.H. (1997). Electron tomography of large, multicomponent biological structures. *J Struct Biol* 120, 219-227.
- Perocchi, F., Jensen, L.J., Gagneur, J., Ahting, U., von Mering, C., Bork, P., Prokisch, H. und Steinmetz, L.M. (2006). Assessing systems properties of yeast mitochondria through an interaction map of the organelle. *PLoS Genet* 2, e170.
- Pfanner, N., Wiedemann, N., Meisinger, C. und Lithgow, T. (2004). Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1044-1048.
- Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R.A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M.L. und Schagger, H. (2003). Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 278, 52873-52880.
- Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A. und Compagno, C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet* 22, 183-186.
- Prokisch, H., Scharfe, C., Camp, D.G., 2nd, Xiao, W., David, L., Andreoli, C., Monroe, M.E., Moore, R.J., Gritsenko, M.A., Kozany, C., *et al.* (2004). Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast. *PLoS Biol* 2, e160.
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W. und Westermann, B. (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 20150-20155.
- Reenan, R.A. und Kolodner, R.D. (1992). Characterization of insertion mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* *MSH1* and *MSH2* genes: evidence for separate mitochondrial and nuclear functions. *Genetics* 132, 975-985.
- Reichert, A.S. und Neupert, W. (2004). Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends Genet* 20, 555-562.
- Reinders, J., Zahedi, R.P., Pfanner, N., Meisinger, C. und Sickmann, A. (2006). Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J Proteome Res* 5, 1543-1554.
- Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17, 208-212.
- Rödel, G. (1986). Two yeast nuclear genes, *CBS1* and *CBS2*, are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5'-untranslated *COB* leader. *Curr Genet* 11, 41-45.

- Rosenfeld, E. und Beauvoit, B. (2003). Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 20, 1115-1144.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sato, A., Nakada, K. und Hayashi, J. (2006). Mitochondrial dynamics and aging: Mitochondrial interaction preventing individuals from expression of respiratory deficiency caused by mutant mtDNA. *Biochim Biophys Acta* 1763, 473-481.
- Schapira, A.H. (2006). Mitochondrial disease. *Lancet* 368, 70-82.
- Schapira, A.H. (2008). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* 33, 2502-2509.
- Schauss, A.C., Bewersdorf, J. und Jakobs, S. (2006). Fis1p and Caf4p, but not Mdv1p, determine the polar localization of Dnm1p clusters on the mitochondrial surface. *J Cell Sci* 119, 3098-3106.
- Scheffler, I.E. (2001). A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* 1, 3-31.
- Schonauer, M.S., Kastaniotis, A.J., Hiltunen, J.K. und Dieckmann, C.L. (2008). Intersection of RNA processing and the type II fatty acid synthesis pathway in yeast mitochondria. *Mol Cell Biol* 28, 6646-6657.
- Schrader, M. und Fahimi, H.D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1755-1766.
- Sedman, T., Kuusk, S., Kivi, S. und Sedman, J. (2000). A DNA helicase required for maintenance of the functional mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20, 1816-1824.
- Semenza, G.L. (2007). Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J* 405, 1-9.
- Sesaki, H. und Jensen, R.E. (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol* 147, 699-706.
- Sesaki, H., Southard, S.M., Yaffe, M.P. und Jensen, R.E. (2003). Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell* 14, 2342-2356.
- Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. und Ames, B.N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10771-10778.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., et al. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13207-13212.
- Sikorski, R.S. und Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Sipos, I., Tretter, L. und Adam-Vizi, V. (2003). Quantitative relationship between inhibition of respiratory complexes and formation of reactive oxygen species in isolated nerve terminals. *J Neurochem* 84, 112-118.
- Skulachev, V.P. (2001). Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci* 26, 23-29.
- Smith, C.P. und Thorsness, P.E. (2005). Formation of an energized inner membrane in mitochondria with a gamma-deficient F₁-ATPase. *Eukaryot Cell* 4, 2078-2086.
- Spurr, A.R. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 26, 31-43.
- Steinmetz, L.M., Scharfe, C., Deutschbauer, A.M., Mokranjac, D., Herman, Z.S., Jones, T., Chu, A.M., Giaever, G., Prokisch, H., Oefner, P.J., et al. (2002). Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat Genet* 31, 400-404.
- Stevens, B.J. und White, J.G. (1979). Computer reconstruction of mitochondria from yeast. *Methods Enzymol* 56, 718-728.
- Suzuki, M., Neutzner, A., Tjandra, N. und Youle, R.J. (2005). Novel structure of the N terminus in yeast Fis1 correlates with a specialized function in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 280, 21444-21452.
- Szabadkai, G., Simoni, A.M., Bianchi, K., De Stefani, D., Leo, S., Wieckowski, M.R. und Rizzuto, R. (2006). Mitochondrial dynamics and Ca²⁺ signaling. *Biochim Biophys Acta* 1763, 442-449.
- Thorpe, G.W., Fong, C.S., Alic, N., Higgins, V.J. und Dawes, I.W. (2004). Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6564-6569.

- Tieu, Q. und Nunnari, J. (2000). Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J Cell Biol* 151, 353-366.
- Tieu, Q., Okreglak, V., Naylor, K. und Nunnari, J. (2002). The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J Cell Biol* 158, 445-452.
- Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y. und Martin, W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* 5, 123-135.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Towpik, J. (2005). Regulation of mitochondrial translation in yeast. *Cell Mol Biol Lett* 10, 571-594.
- Trancikova, A., Weisova, P., Kissova, I., Zeman, I. und Kolarov, J. (2004). Production of reactive oxygen species and loss of viability in yeast mitochondrial mutants: protective effect of Bcl-xL. *FEMS Yeast Res* 5, 149-156.
- Traven, A., Wong, J.M., Xu, D., Sopta, M. und Ingles, C.J. (2001). Interorganellar communication. Altered nuclear gene expression profiles in a yeast mitochondrial dna mutant. *J Biol Chem* 276, 4020-4027.
- Truscott, K.N., Kovermann, P., Geissler, A., Merlin, A., Meijer, M., Driessen, A.J., Rassow, J., Pfanner, N. und Wagner, R. (2001). A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol* 8, 1074-1082.
- Tzagoloff, A. und Dieckmann, C.L. (1990). *PET* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 54, 211-225.
- Tzagoloff, A., Nobrega, M., Gorman, N. und Sinclair, P. (1993). On the functions of the yeast *COX10* and *COX11* gene products. *Biochem Mol Biol Int* 31, 593-598.
- Valencik, M.L., Kloeckener-Gruissem, B., Poyton, R.O. und McEwen, J.E. (1989). Disruption of the yeast nuclear *PET54* gene blocks excision of mitochondrial intron a15 beta from pre-mRNA for cytochrome c oxidase subunit I. *EMBO J* 8, 3899-3904.
- Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W. und Reichert, A.S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* 175, 237-247.
- Vongsamphanh, R., Fortier, P.K. und Ramotar, D. (2001). Pir1p mediates translocation of the yeast Apn1p endonuclease into the mitochondria to maintain genomic stability. *Mol Cell Biol* 21, 1647-1655.
- Warren, G. und Wickner, W. (1996). Organelle inheritance. *Cell* 84, 395-400.
- Westermann, B. und Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16, 1421-1427.
- Westermann, B., Herrmann, J.M. und Neupert, W. (2001). Analysis of mitochondrial translation products in vivo and in organello in yeast. *Methods Cell Biol* 65, 429-438.
- Westermann, B. (2008). Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. *J Biol Chem* 283, 13501-13505.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Gorsich, S.W., McCaffery, J.M., Shaw, J.M. und Nunnari, J. (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol* 151, 341-352.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Scott, S.V., Okreglak, V., Holewinski, T.J., Cassidy-Stone, A. und Nunnari, J. (2003). The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 160, 303-311.
- Wurm, C.A. und Jakobs, S. (2006). Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. *FEBS Lett* 580, 5628-5634.
- Wysocki, R., Roganti, T., Van Dyck, E., de Kerchove D'Exaerde, A. und Foury, F. (1999). Disruption and basic phenotypic analysis of 18 novel genes from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 165-171.
- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G.J. und Woese, C.R. (1985). Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4443-4447.
- Youle, R.J. und Karbowski, M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 657-663.

- Zahedi, R.P., Sickmann, A., Boehm, A.M., Winkler, C., Zufall, N., Schonfisch, B., Guiard, B., Pfanner, N. und Meisinger, C. (2006). Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Mol Biol Cell* 17, 1436-1450.
- Zambrano, A., Fontanesi, F., Solans, A., de Oliveira, R.L., Fox, T.D., Tzagoloff, A. und Barrientos, A. (2007). Aberrant translation of cytochrome *c* oxidase subunit 1 mRNA species in the absence of Mss51p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 18, 523-535.
- Zelenaya-Troitskaya, O., Perlman, P.S. and Butow, R.A. (1995) An enzyme in yeast mitochondria that catalyzes a step in branched-chain amino acid biosynthesis also functions in mitochondrial DNA stability. *EMBO J* 14, 3268-76.
- Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N. und Haugland, R.P. (1997). A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem* 253, 162-168.

6 ANHANG

Tabelle A1: Aus der *MAT α* -Deletionsbibliothek isolierte *pet*-Gene. Aufgeführt sind systematische und Standardnamen der Gene. Angaben zu zellulären Funktionen der Genprodukte stammen aus der *Saccharomyces* Genome Database (SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002) oder manuellen Annotationen (entnommen aus Merz & Westermann, zur Publikation eingereicht).

YAL009W	SPO7, ER membrane protein of unknown function
YAL010C	MDM10, involved in mitochondrial morphology and inheritance
YAL013W	DEP1, transcriptional modulator
YAL026C	DRS2, maintains membrane lipid asymmetry in post-Golgi secretory vesicles
YAL039C	CYC3, holocytochrome c synthase (cytochrome c heme lyase)
YAL044C	GCV3, glycine decarboxylase hydrogen carrier protein H subunit
YBL019W	APN2, Class II abasic (AP) endonuclease; repair of DNA damage; homolog of hHAP1
YBL021C	HAP3, component of heterotrimeric CCAAT-binding factor
YBL031W	SHE1 Cytoskeletal protein of unknown function; overexpression causes growth arrest
YBL032W	HEK2, RNA binding protein; localizes ASH1 mRNA
YBL036C	non-specific single-domain racemase
YBL045C	COR1, ubiquinol cytochrome c reductase core protein 1
YBL046W	PSY4, regulatory subunit of a protein phosphatase complex (nuclear)
YBL053W	Dubious ORF, overlaps with SAS3n
YBL057C	PTH2, negatively regulates the ubiquitin-proteasome pathway
YBL062W	Dubious ORF, overlaps with SKT5
YBL080C	PET112, Protein required for mitochondrial translation
YBL082C	ALG3, alpha(1-3) mannosyltransferase
YBL090W	MRP21, mitochondrial ribosomal protein
YBL093C	ROX3, RNA polymerase II holoenzyme component
YBL099W	ATP1, alpha subunit of F1-ATP synthase
YBL100C	Dubious ORF, overlaps with ATP1
YBR003W	COQ1, hexaprenyl pyrophosphate synthetase
YBR026C	ETR1, localized to in mitochondria, where it has a probable role in fatty acid synthesis
YBR039W	ATP3, Gamma subunit of the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase
YBR097W	VPS15, serine/threonine protein kinase involved in vacuolar protein sorting
YBR128C	ATG14, Subunit of an autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex
YBR146W	MRPS9, Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YBR179C	FZO1, transmembrane GTPase required for mitochondrial fusion
YBR251W	MRPS5, mitochondrial ribosomal protein
YBR268W	MRPL37, mitochondrial ribosomal protein
YBR282W	MRPL27, mitochondrial ribosomal protein
YBR283C	SSH1, involved in co-translational protein translocation in the ER
YBR289W	SNF5, component of SWI-SNF global transcription activator complex
YCL001W-A	Unknown function
YCL007C	Dubious ORF; overlaps verified ORF YCL005W-A
YCL010C	SGF29, Probable 29kDa Subunit of SAGA histone acetyltransferase complex
YCR003W	MRPL32, mitochondrial ribosomal protein
YCR020W-B	HTL1, Subunit of the RSC chromatin remodeling complex
YCR024C	SLM5, Asparaginyl-tRNA synthetase, mitochondrial
YCR028C-A	RIM1, binds single-stranded DNA, required for DNA replication in mitochondria
YCR046C	IMG1, Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YCR071C	IMG2, Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YDL012C	Plasma membrane protein of unknown function
YDL033C	SLM3, tRNA-specific 2-thiouridylase
YDL039C	PRM7, Pheromone-regulated protein
YDL044C	MTF2, mitochondrial protein involved in mRNA splicing and protein synthesis
YDL045W-A	MRP10, mitochondrial ribosomal protein
YDL056W	MBP1, transcription factor that collaborates with Swi6p
YDL067C	COX9, cytochrome c oxidase subunit VIIA

YDL068W	Dubious ORF, overlaps with CBS1
YDL077C	VAM6, Vacuolar protein, tethers steps of vacuolar membrane fusion
YDL091C	UBX3, UBX domain-containing protein that interacts with Cdc48p
YDL099W	BUG1, involved in ER to Golgi transport
YDL107W	MSS2, required for export of C-terminal tail of Cox2p through the inner membrane
YDL114W	Putative protein of unknown function with similarity to acyl-carrier-protein reductases
YDL129W	Unknown function
YDL133W	Unknown function
YDL157C	unknown function; detected in highly purified mitochondria in high-throughput studies
YDL185W	VMA1, catalytic subunit (subunit A) of the vacuolar H(+) ATPase V1 complex
YDL192W	ARF1, GTPase of the Ras superfamily involved in coated vesicles formation
YDR010C	Dubious ORF
YDR025W	RPS11A, Protein component of the small (40S) ribosomal subunit
YDR065W	Unknown function
YDR079W	PET100, required for assembly of cytochrome c oxidase
YDR114C	Dubious ORF, overlaps with YDR115W
YDR115W	Putative mitochondrial ribosomal protein
YDR116C	MRPL1, Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YDR129C	SAC6, actin filament bundling protein, fimbrin; essential for polarized secretion
YDR148C	KGD2, 2-oxoglutarate dehydrogenase complex E2 component
YDR175C	RSM24, mitochondrial ribosomal protein
YDR194C	MSS116, mitochondrial RNA helicase, required for splicing of group II introns
YDR197W	CBS2, translational activator for cyt b
YDR204W	COQ4, involved in biosynthesis of coenzyme Q
YDR230W	Dubious ORF, overlaps with COX20
YDR237W	MRPL7, mitochondrial ribosomal protein
YDR269C	Dubious ORF, overlaps with CCC2
YDR270W	CCC2, copper-transporting P-type ATPase
YDR271C	Dubious ORF, overlaps with CCC2
YDR296W	MHR1, involved in repair, recombination and maintenance of mitochondrial DNA
YDR298C	ATP5, subunit 5 of F ₀ -ATP synthase, oligomycin sensitivity-conferring subunit
YDR337W	MRPS28, mitochondrial ribosomal protein
YDR347W	MRP1, mitochondrial ribosomal protein
YDR350C	ATP22, required for assembly of the F ₀ sector of mitochondrial F ₁ F ₀ ATP synthase
YDR364C	CDC40, pre-mRNA splicing factor
YDR375C	BCS1, required for expression of functional Rieske iron-sulfur protein
YDR377W	ATP17, ATP synthase subunit f
YDR448W	ADA2, component of the histone acetyltransferase complexes
YDR458C	HEH2, Protein of unknown function; GFP-fusion protein in nuclear periphery
YDR491C	Dubious ORF, overlaps with IZH1
YDR523C	SPS1, Putative protein serine/threonine kinase
YDR529C	QCR7, ubiquinol cytochrome c reductase subunit 7
YEL024W	RIP1, ubiquinol cytochrome c reductase iron-sulfur protein
YEL027W	CUP5, V-ATPase 16 kDa proteolipid subunit of membrane (V ₀) sector
YEL050C	RML2, mitochondrial ribosomal protein L2 of the large subunit
YEL051W	VMA8, vacuolar H(+)-ATPase (V-ATPase) subunit of the V1 catalytic sector
YEL059C-A	SOM1, Subunit of the mitochondrial inner membrane peptidase
YER014C-A	BUD25, involved in bipolar budding
YER017C	AFG3, involved in proteolytic and chaperone activities at the inner membrane
YER050C	RSM18, component of the mitochondrial ribosomal small subunit
YER061C	CEM1, beta-ketoacyl-ACP synthase, mitochondrial
YER070W	RNR1, ribonucleosid-diphosphate-reductase, large (R1) subunit
YER087W	similarity to tRNA synthetases; protein is detected in mitochondria
YER114C	BOI2, Protein implicated in polar growth, functionally redundant with Boi1p
YER131W	RPS26B, Protein component of the small (40S) ribosomal subunit
YER145C	FTR1, iron permease that mediates high-affinity iron uptake
YER154W	OXA1, component of the mitochondrial protein export machinery
YER155C	BEM2, Rho GTPase activating protein; control of cytoskeleton organization
YFL016C	MDJ1, DnaJ co-chaperone involved in mitochondrial biogenesis and protein folding
YGL017W	ATE1, Arginyl-tRNA-protein transferase
YGL070C	RPB9, RNA polymerase II, non-essential subunit, not shared
YGL071W	RCS1, transcription factor regulates genes involved in iron uptake and cell size

YGL129C	RSM23, mitochondrial ribosomal protein
YGL135W	RPL1B, large subunit ribosomal protein L1
YGL143C	MRF1, mitochondrial peptide chain release factor
YGL165C	Dubious ORF, overlaps with CUP2
YGL206C	CHC1, clathrin heavy chain
YGL218W	Dubious ORF, overlaps with MDM34
YGL237C	HAP2, component of heterotrimeric CCAAT-binding factor
YGL240W	DOC1, anaphase promoting complex (APC10)
YGL244W	RTF1, pol II transcription elongation factor, regulates DNA binding properties of TBP
YGL251C	HFM1, Meiosis specific DNA helicase
YGR020C	VMA7, vacuolar H(+)-ATPase 14 kDa subunit of the catalytic (V0) sector
YGR062C	COX18, required for activity of mitochondrial cytochrome oxidase
YGR076C	MRPL25, mitochondrial ribosomal protein
YGR102C	Unknown function, located in mitochondria
YGR105W	VMA21, required for vacuolar H(+)-ATPase (V-ATPase) assembly
YGR112W	SHY1, mitochondrial protein required for assembly of cytochrome c oxidase complex
YGR150C	Unknown function, located in mitochondria
YGR155W	CYS4, cystathionine beta-synthase
YGR167W	CLC1, clathrin light chain
YGR171C	MSM1, Met-tRNA synthetase, mitochondrial
YGR180C	RNR4, component of ribonucleotide reductase small subunit
YGR215W	RSM27, mitochondrial ribosomal protein
YGR220C	MRPL9, mitochondrial ribosomal protein
YGR222W	PET54, specific translational activator for COX3
YGR243W	FMP43, protein was localized to mitochondria
YGR262C	BUD32, may be involved in polar bud-site selection
YHL038C	CBP2, required for splicing of the COB a15 intron and 21S mitochondrial rRNA intron
YHR006W	STP2, Transcription factor; activates transcription of amino acid permease genes
YHR009C	Unknown function
YHR011W	DIA4, tRNA synthetase, may be involved in mitochondrial function
YHR026W	PPA1, proteolipid of the vacuolar H(+)-ATPase
YHR038W	RRF1, Mitochondrial ribosome recycling factor, essential for respiratory function
YHR039C	MSC7, Protein of unknown function, GFP-fusion protein in endoplasmic reticulum
YHR039C-B	VMA10, vacuolar H(+)-ATPase (V-ATPase) 13 kDa subunit
YHR049C-A	Dubious ORF
YHR051W	COX6, cytochrome c oxidase subunit VI
YHR060W	VMA22, protein involved in vacuolar H(+)-ATPase assembly or function
YHR067W	HTD2, involved in mitochondrial fatty acid biosynthesis
YHR091C	MSR1, arginyl-tRNA synthetase of mitochondria
YHR120W	MSH1, involved in mitochondrial DNA repair
YHR147C	MRPL6, mitochondrial ribosomal protein
YHR168W	MTG2, mitochondrial GTPase, possibly involved in ribosome assembly
YIL125W	KGD1, alpha-Ketoglutarate dehydrogenase
YIL157C	COA1, required for assembly of the cytochrome c oxidase complex
YIR021W	MRS1, protein involved in mitochondrial RNA splicing of COB mRNA
YJL003W	COX16, required for assembly of cytochrome c oxidase
YJL046W	Similarity to lipoate-protein ligase A
YJL062W-A	Putative protein of unknown function, GFP-fusion protein localizes to the mitochondria
YJL063C	MRPL8, mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YJL096W	MRPL49, mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YJL102W	MEF2, mitochondrial translation elongation factor
YJL120W	Dubious ORF, overlaps with RPE1
YJL121C	RPE1, ribulose-5-phosphate 3-epimerase
YJL124C	LSM1, involved in degradation of cytoplasmic mRNAs
YJL176C	SWI3, component of SWI-SNF global transcription activator complex
YJL180C	ATP12, F1-ATP synthase assembly protein
YJL184W	GON7, unknown function
YJL209W	CBP1, required for COB mRNA stability or 5' processing
YJR040W	GEF1, voltage-gated chloride channel
YJR077C	MIR1, phosphate transporter of the mitochondrial carrier (MCF) family
YJR113C	RSM7, Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YJR121W	ATP2, beta subunit of F1-ATP synthase

YJR122W	CAF17, component of the CCR4 transcription complex
YJR144W	MGM101, mitochondrial genome maintenance protein
YKL003C	MRP17, mitochondrial ribosomal protein
YKL016C	ATP7, ATP synthase subunit d
YKL040C	NFU1, homeostasis of metal ions, Nifu-like protein (NUB1)
YKL055C	OAR1, mitochondrial type II fatty acid synthase
YKL080W	VMA5, vacuolar H(+)-ATPase (V-ATPase) hydrophilic subunit (subunit C)
YKL109W	HAP4, component of heterotrimeric CCAAT-binding factor
YKL114C	APN1, Major apurinic/apyrimidinic endonuclease, repair of DNA damage
YKL119C	VPH2, vacuolar H(+)-ATPase (V-ATPase) assembly protein acting in the ER
YKL134C	OCT1, mitochondrial intermediate peptidase
YKL138C	MRPL31, mitochondrial ribosomal protein
YKL155C	RSM22, mitochondrial ribosomal protein
YKL169C	Dubious ORF, overlaps with MRPL38
YKL170W	MRPL38, mitochondrial ribosomal protein
YKL194C	MST1, mitochondrial threonyl tRNA synthase
YKR006C	MRPL13, mitochondrial ribosomal protein
YKR085C	MRPL20, mitochondrial ribosomal protein
YLL018C-A	COX19, required for cytochrome c oxidase assembly
YLL027W	ISA1, mitochondrial protein required for normal iron metabolism
YLL033W	Unknown function
YLL041C	SDH2, iron-sulfur protein subunit of succinat dehydrogenase
YLL042C	ATG10, E2-like conjugating enzyme, involved in autophagy
YLR038C	COX12, cytochrome-c oxidase, subunit VIb
YLR056W	ERG3, C-5 sterol desaturase (microsomal membrane)
YLR067C	PET309, required for stability and translation of COX1 mRNA
YLR069C	MEF1, mitochondrial translation elongation factor G
YLR070C	XYL2, Xylitol dehydrogenase, converts xylitol to D-xylulose
YLR091W	Unknown function, located in mitochondria
YLR125W	Unknown function
YLR139C	SLS1, protein involved in mitochondrial metabolism
YLR144C	ACF2, beta-1,3-endoglucanase; probable role in cortical actin cytoskeleton assembly
YLR201C	COQ9, Mitochondrial inner membrane protein required for ubiquinone biosynthesis
YLR202C	Dubious ORF, overlaps with YLR201C and MSS51
YLR203C	MSS51, mitochondrial protein required for respiratory growth and translation of COX1
YLR260W	LCB5, long chain base kinase, involved in sphingolipid metabolism
YLR270W	DCS1, Non-essential hydrolase involved in mRNA decapping
YLR294C	Dubious ORF, overlaps with ATP14
YLR295C	ATP14, ATP synthase subunit h
YLR304C	ACO1, aconitase
YLR312W-A	MRPL15, mitochondrial ribosomal protein
YLR337C	VRP1, involved in cytoskeletal organization and cytokinesis
YLR369W	SSQ1, mitochondrial Hsp70 involved in biogenesis of iron-sulfur proteins
YLR382C	NAM2, leucyl-tRNA synthetase, mitochondrial,
YLR439W	MRPL4, mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YLR447C	VMA6, vacuolar H(+)-ATPase (V-ATPase) 36 kDa subunit
YML061C	PIF1, single-stranded DNA-dependent ATPase and 5'-3' DNA helicase
YML087C	Unknown function
YML110C	COQ5, involved in ubiquinone biosynthesis
YML120C	NDI1, NADH:ubiquinone oxidoreductase
YMR015C	ERG5, C-22 sterol desaturase
YMR021C	MAC1, Copper-sensing transcription factor
YMR035W	IMP2, catalytic subunit of the mitochondrial inner membrane protease Imp
YMR064W	AEP1, required for accumulation of transcript of ATP9/OLI1
YMR070W	MOT3, Nuclear transcription factor; e.g. repression of ergosterol biosynthetic genes
YMR072W	ABF2, DNA-binding protein required for maintenance of mitochondrial genome
YMR077C	VPS20, Myristoylated subunit of the endosomal sorting complex
YMR089C	YTA12, involved in proteolytic and chaperone activities in the inner membrane
YMR097C	MTG1, likely functions in assembly of the large ribosomal subunit
YMR098C	ATP25, required for stability of ATP9 mRNA
YMR150C	IMP1, catalytic subunit of the mitochondrial inner membrane protease Imp
YMR151W	YIM2, Dubious ORF, overlaps with IMP1

YMR158W	MRPS8, Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YMR188C	MRPS17, Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YMR193W	MRPL24, mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YMR228W	MTF1, mitochondrial RNA polymerase specificity factor
YMR256C	COX7, cytochrome c oxidase, subunit VII
YMR257C	PET111, required for mitochondrial translation of COX2 mRNA
YMR267W	PPA2, inorganic pyrophosphatase, mitochondrial
YMR282C	AEP2, required for the expression of Atp9p
YMR286W	MRPL33, mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YMR287C	DSS1, RNase, associates with the ribosome, turnover of aberrant RNAs
YMR293C	May be involved in mitochondrial function
YNL005C	MRP7, mitochondrial ribosomal protein
YNL052W	COX5A, cytochrome c oxidase subunit Va
YNL073W	MSK1, lysyl-tRNA synthetase, mitochondrial
YNL081C	Putative mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YNL138W	SRV2, adenylate cyclase-associated protein
YNL159C	ASI2, Integral inner nuclear membrane protein
YNL170W	Dubious ORF, overlaps with PSD1
YNL177C	MRPL22, Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YNL184C	Dubious ORF, overlaps with MRPL19
YNL185C	MRPL19, Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YNL213C	Unknown function, located in mitochondria
YNL252C	MRPL17, mitochondrial ribosomal protein
YNL315C	ATP11, F1-ATP synthase assembly protein
YNR020C	ATP23, metalloprotease required for processing of Atp6
YNR037C	RSM19, Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YNR041C	COQ2, para-hydroxybenzoate-polyprenyltransferase
YNR042W	Dubious ORF, overlaps with COQ2
YNR045W	PET494, translational activator required for mitochondrial translation of COX3
YOL008W	COQ10, Coenzyme Q binding protein
YOL009C	MDM12, mitochondrial morphology and inheritance protein
YOL033W	MSE1, glutamyl-tRNA synthetase, mitochondrial
YOL051W	GAL11, Component of RNA polymerase II holoenzyme
YOL071W	EMI5, non-essential protein of unknown function
YOL083W	Unknown function
YOL095C	HMI1, mitochondrial DNA helicase involved in maintenance of mtDNA
YOL096C	COQ3, catalyzes two different O-methylation steps in ubiquinone biosynthesis
YOR036W	PEP12, syntaxin homolog (t-SNARE) involved in Golgi to vacuole transport
YOR065W	CYT1, cytochrome c1
YOR127W	RGA1, GTPase-activating protein for Cdc42p
YOR150W	MRPL23, Mitochondrial ribosomal protein
YOR155C	ISN1, Inosine 5'-monophosphate (IMP)-specific 5'-nucleotidase, breakdown of IMP
YOR158W	PET123, mitochondrial ribosomal protein
YOR187W	TUF1, translation elongation factor Tu, mitochondrial
YOR200W	Dubious ORF, overlaps with PET56
YOR211C	MGM1, peripheral membrane protein required for mitochondrial morphology
YOR221C	MCT1, mitochondrial type II fatty acid synthase
YOR241W	MET7, required for methionine synthesis and for maintenance of mitochondrial DNA
YOR305W	Unknown function, probably mitochondrial
YOR318C	Dubious ORF unlikely to encode a protein
YOR330C	MIP1, mitochondrial DNA-directed DNA polymerase
YOR331C	Dubious ORF, overlaps with VMA4
YOR332W	VMA4, vacuolar H(+)-ATPase hydrophilic subunit (subunit E)
YOR350C	MNE1, similar to <i>Lucilia illustris</i> mitochondrial cytochrome oxidase
YOR358W	HAP5, component of heterotrimeric CCAAT-binding factor
YOR375C	GDH1, NADP(+)-dependent glutamate dehydrogenase
YOR380W	RDR1, Transcriptional repressor, control of multidrug resistance
YPL013C	MRPS16, Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YPL031C	PHO85, cyclin-dependent kinase
YPL045W	VPS16, vacuolar sorting protein
YPL059W	GRX5, mitochondrial protein involved in the synthesis/assembly of iron-sulfur centers
YPL078C	ATP4, subunit 4 of F0-ATP synthase

YPL097W	MSY1, tyrosyl-tRNA synthetase, mitochondrial
YPL104W	MSD1, aspartyl-tRNA synthetase, mitochondrial
YPL132W	COX11, required for heme A synthesis
YPL136W	Dubious ORF, overlaps with GIP3
YPL148C	PPT2, activates mitochondrial acyl carrier protein
YPL172C	COX10, farnesyl transferase required for heme A synthesis
YPL173W	MRPL40, mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YPL188W	POS5, mitochondrial NADH kinase; required for the response to oxidative stress
YPL189C-A	COA2, Cytochrome oxidase assembly factor
YPL215W	CBP3, required for assembly of cytochrome bc1 complex
YPL234C	VMA11, proteolipid component of V-ATPase
YPL254W	HFI1, component of the ADA complex
YPL262W	FUM1, fumarate hydratase
YPL271W	ATP15, epsilon subunit of F1-ATP synthase
YPR036W	VMA13, vacuolar H(+)-ATPase (V-ATPase) 54 kDa subunit of V1 sector)
YPR066W	UBA3, Rub1-activating enzyme, similar to ubiquitin-activating E1 protein
YPR067W	ISA2, mitochondrial protein required for iron metabolism
YPR099C	Dubious ORF, overlaps with MRPL51
YPR116W	Unknown function
YPR123C	Dubious ORF, overlaps with CTR1
YPR191W	QCR2, ubiquinol cytochrome c reductase core protein 2

Tabelle A2: Gruppierung der *pet*-Gene anhand ihrer Detektionsfrequenz in den *pet*-Screens nach Dimmer *et al.*, (2002), Luban *et al.*, (2005) und Merz & Westermann (vorliegende Arbeit), sowie anhand der Lokalisation und Funktion der Genprodukte. Aufgeführt sind systematische und Standardnamen der Gene. Angaben zu zellulären Funktionen der Genprodukte stammen aus der SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002) oder manuellen Annotationen (entnommen aus Merz & Westermann, zur Publikation eingereicht).

176 *pet* genes found in three screens (163 genes excluding questionable ORFs)

KNOWN MITOCHONDRIAL PROTEINS (129 GENES)

Mitochondrial DNA metabolism (8 genes)

YCR028C-A	RIM1, binds single-stranded DNA, required for DNA replication in mitochondria
YDR296W	MHR1, involved in repair, recombination and maintenance of mitochondrial DNA
YHR120W	MSH1, involved in mitochondrial DNA repair
YJR144W	MGM101, mitochondrial genome maintenance protein
YML061C	PIF1, single-stranded DNA-dependent ATPase and 5'-3' DNA helicase
YMR072W	ABF2, DNA-binding protein required for maintenance of mitochondrial genome
YOL095C	HMI1, mitochondrial DNA helicase involved in maintenance of mitochondrial genome
YOR330C	MIP1, mitochondrial DNA-directed DNA polymerase

Mitochondrial RNA synthesis (7 genes)

YDL044C	MTF2, mitochondrial protein involved in mRNA splicing and protein synthesis
YDR194C	MSS116, mitochondrial RNA helicase, required for splicing of group II introns
YHL038C	CBP2, required for splicing of the COB a15 intron and 21S mitochondrial rRNA intron
YIR021W	MRS1, protein involved in mitochondrial RNA splicing of COB mRNA
YLR067C	PET309, required for stability and translation of COX1 mRNA
YMR098C	ATP25, required for stability of ATP9 mRNA
YMR228W	MTF1, mitochondrial RNA polymerase specificity factor

Mitochondrial protein synthesis (63 genes)

Mitochondrial ribosomal subunits (39 genes)

YBL090W	MRP21, mitochondrial ribosomal protein
YBR282W	MRPL27, mitochondrial ribosomal protein
YCR003W	MRPL32, mitochondrial ribosomal protein
YCR046C	IMG1, mitochondrial ribosomal protein
YCR071C	IMG2, mitochondrial ribosomal protein
YDL045W-A	MRP10, mitochondrial ribosomal protein
YDR115W	Putative mitochondrial ribosomal protein
YDR175C	RSM24, mitochondrial ribosomal protein
YDR237W	MRPL7, mitochondrial ribosomal protein
YDR337W	MRPS28, mitochondrial ribosomal protein
YER050C	RSM18, mitochondrial ribosomal protein
YGL129C	RSM23, mitochondrial ribosomal protein
YGR076C	MRPL25, mitochondrial ribosomal protein
YGR215W	RSM27, mitochondrial ribosomal protein
YGR220C	MRPL9, mitochondrial ribosomal protein
YHR147C	MRPL6, mitochondrial ribosomal protein
YJL063C	MRPL8, mitochondrial ribosomal protein
YJL096W	MRPL49, mitochondrial ribosomal protein
YJR113C	RSM7, mitochondrial ribosomal protein
YKL003C	MRP17, mitochondrial ribosomal protein
YKL138C	MRPL31, mitochondrial ribosomal protein
YKL155C	RSM22, mitochondrial ribosomal protein
YKL170W	MRPL38, mitochondrial ribosomal protein
YKR006C	MRPL13, mitochondrial ribosomal protein
YKR085C	MRPL20, mitochondrial ribosomal protein
YLR312W-A	MRPL15, mitochondrial ribosomal protein
YLR439W	MRPL4, mitochondrial ribosomal protein
YMR158W	MRPS8, mitochondrial ribosomal protein
YMR193W	MRPL24, mitochondrial ribosomal protein

YMR286W	MRPL33, mitochondrial ribosomal protein
YNL005C	MRP7, mitochondrial ribosomal protein
YNL081C	Putative mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YNL177C	MRPL22, mitochondrial ribosomal protein
YNL252C	MRPL17, mitochondrial ribosomal protein
YNR037C	RSM19, mitochondrial ribosomal protein
YOR150W	MRPL23, mitochondrial ribosomal protein
YOR158W	PET123, mitochondrial ribosomal protein
YPL013C	MRPS16, mitochondrial ribosomal protein
YPL173W	MRPL40, mitochondrial ribosomal protein
<u>Mitochondrial tRNA synthetases (10 genes)</u>	
YCR024C	SLM5, Asparaginyl-tRNA synthetase, mitochondrial
YER087W	Similarity to tRNA synthetases; protein is detected in mitochondria
YGR171C	MSM1, Met-tRNA synthetase, mitochondrial
YHR011W	DIA4, tRNA synthetase, may be involved in mitochondrial function
YHR091C	MSR1, arginyl-tRNA synthetase, mitochondrial
YLR382C	NAM2, leucyl-tRNA synthetase, mitochondrial
YNL073W	MSK1, lysyl-tRNA synthetase, mitochondrial
YOL033W	MSE1, glutamyl-tRNA synthetase, mitochondrial
YPL097W	MSY1, tyrosyl-tRNA synthetase, mitochondrial
YPL104W	MSD1, aspartyl-tRNA synthetase, mitochondrial
<u>Other (14 genes)</u>	
YDR197W	CBS2, translational activator for cyt b
YGL143C	MRF1, mitochondrial peptide chain release factor
YGR222W	PET54, specific translational activator for COX3
YHR038W	RRF1, mitochondrial ribosome recycling factor, essential for respiratory function
YHR168W	MTG2, mitochondrial GTPase, possibly involved in ribosome assembly
YJL102W	MEF2, mitochondrial translation elongation factor
YLR069C	MEF1, mitochondrial translation elongation factor G
YLR203C	MSS51, mitochondrial protein required for respiratory growth and translation of COX1
YMR064W	AEP1, required for accumulation of transcript of ATP9/OLI1
YMR097C	MTG1, likely functions in assembly of the large ribosomal subunit
YMR257C	PET111, required for mitochondrial translation of COX2 mRNA
YMR282C	AEP2, required for the expression of Atp9p
YMR287C	DSS1, RNase, associates with the ribosome, turnover of aberrant RNAs
YOR187W	TUF1, translation elongation factor Tu, mitochondrial
Respiratory chain (24 genes)	
<u>Cytochrome bc₁ complex (Ubiquinol-cytochrome c reductase complex, complex III) (4 genes)</u>	
YBL045C	COR1, ubiquinol cytochrome c reductase core protein 1
YEL024W	RIP1, ubiquinol cytochrome c reductase iron-sulfur protein
YOR065W	CYT1, cytochrome c1
YPR191W	QCR2, ubiquinol cytochrome c reductase core protein 2
<u>Cytochrome c oxidase (complex IV) (5 genes)</u>	
YDL067C	COX9, cytochrome c oxidase subunit VIIA
YHR051W	COX6, cytochrome c oxidase subunit VI
YLR038C	COX12, cytochrome-c oxidase, subunit VIb
YMR256C	COX7, cytochrome c oxidase, subunit VII
YNL052W	COX5A, cytochrome c oxidase subunit Va
<u>F₀/F₁ ATP synthase (complex V) (7 genes)</u>	
YBL099W	ATP1, alpha subunit of F ₁ -ATP synthase
YDR298C	ATP5, subunit 5 of F ₀ -ATP synthase, oligomycin sensitivity-conferring subunit
YDR377W	ATP17, ATP synthase subunit f
YJR121W	ATP2, beta subunit of F ₁ -ATP synthase
YKL016C	ATP7, ATP synthase subunit d
YPL078C	ATP4, subunit 4 of F ₀ -ATP synthase
YPL271W	ATP15, epsilon subunit of F ₁ -ATP synthase
<u>Assembly factors (8 genes)</u>	
YAL039C	CYC3, holocytochrome c synthase (cytochrome c heme lyase)
YDR079W	PET100, required for assembly of cytochrome c oxidase
YGR062C	COX18, required for activity of mitochondrial cytochrome oxidase
YGR112W	SHY1, mitochondrial protein required for assembly of cytochrome c oxidase complex

YJL180C	ATP12, F1-ATP synthase assembly protein
YLL018C-A	COX19, required for cytochrome c oxidase assembly
YNL315C	ATP11, F1-ATP synthase assembly protein
YPL215W	CBP3, required for assembly of cytochrome bc ₁ complex

Mitochondrial enzymes (11 genes)

YAL044C	GCV3, glycine decarboxylase hydrogen carrier protein H subunit
YBR003W	COQ1, hexaprenyl pyrophosphate synthetase
YDR148C	KGD2, 2-oxoglutarate dehydrogenase complex E2 component
YDR204W	COQ4, involved in biosynthesis of coenzyme Q
YER061C	CEM1, beta-ketoacyl-ACP synthase, mitochondrial
YLR201C	COQ9, mitochondrial inner membrane protein required for ubiquinone biosynthesis
YLR304C	ACO1, aconitase
YMR267W	PPA2, inorganic pyrophosphatase, mitochondrial
YNR041C	COQ2, para-hydroxybenzoate-polyprenyltransferase
YPL132W	COX11, required for heme A synthesis
YPL172C	COX10, farnesyl transferase required for heme A synthesis

Lipids biosynthesis, mitochondrial (5 genes)

YBR026C	ETR1, localized to in mitochondria, where it has a probable role in fatty acid synthesis
YHR067W	HTD2, involved in mitochondrial fatty acid biosynthesis
YKL055C	OAR1, mitochondrial type II fatty acid synthase
YOR221C	MCT1, mitochondrial type II fatty acid synthase
YPL148C	PPT2, activates mitochondrial acyl carrier protein

Mitochondrial proteases and peptidases (4 genes)

YER017C	AFG3, involved in proteolytic and chaperone activities at the inner membrane
YKL134C	OCT1, mitochondrial intermediate peptidase
YMR089C	YTA12, involved in proteolytic and chaperone activities in the inner membrane
YMR150C	IMP1, catalytic subunit of the mitochondrial inner membrane protease Imp

Mitochondrial morphology (1 gene)

YOR211C	MGM1, peripheral membrane protein required for mitochondrial morphology
---------	---

Other mitochondrial factors (6 genes)

YDL107W	MSS2, required for export of C-terminal tail of Cox2p through the inner membrane
YER154W	OXA1, component of the mitochondrial protein export machinery
YFL016C	MDJ1, DnaJ co-chaperone involved in mitochondrial biogenesis and protein folding
YLL027W	ISA1, mitochondrial protein required for normal iron metabolism
YLR139C	SLS1, protein involved in mitochondrial metabolism
YPR067W	ISA2, mitochondrial protein required for iron metabolism

KNOWN NON-MITOCHONDRIAL PROTEINS (26 GENES)**Vacuole (12 genes)**V-ATPase subunits (9 genes)

YBR127C	VMA2, V-ATPase regulatory subunit
YDL185W	VMA1, V-ATPase catalytic subunit (subunit A)
YEL027W	CUP5, V-ATPase 16 kDa proteolipid subunit of membrane (V0) sector
YEL051W	VMA8, V-ATPase subunit of the V1 catalytic sector
YHR039C-B	VMA10, V-ATPase 13 kDa subunit
YKL080W	VMA5, V-ATPase hydrophilic subunit (subunit C)
YLR447C	VMA6, V-ATPase 36 kDa subunit
YOR332W	VMA4, V-ATPase hydrophilic subunit (subunit E)
YPL234C	VMA11, V-ATPase proteolipid component

V-ATPase assembly (2 genes)

YGR105W	VMA21, required for V-ATPase assembly
YHR060W	VMA22, involved in V-ATPase assembly or function

Vacuolar inheritance and protein sorting factors (1 gene)

YPL045W	VPS16, vacuolar sorting protein
---------	---------------------------------

Lipids biosynthesis, non-mitochondrial or unspecified (1 gene)

YLR260W	LCB5, long chain base kinase, involved in sphingolipid metabolism
---------	---

Transcription (nuclear) (8 genes)Heterotrimeric CCAAT-binding factor (4 genes)

YBL021C	HAP3, component of heterotrimeric CCAAT-binding factor
YGL237C	HAP2, component of heterotrimeric CCAAT-binding factor

YKL109W HAP4, component of heterotrimeric CCAAT-binding factor
 YOR358W HAP5, component of heterotrimeric CCAAT-binding factor

Other (4 genes)

YGL070C RPB9, RNA polymerase II, non-essential subunit, not shared
 YGL071W RCS1, transcription factor regulates genes involved in iron uptake and cell size
 YJL176C SWI3, component of SWI-SNF global transcription activator complex
 YJR122W CAF17, component of the CCR4 transcription complex

Non-mitochondrial metabolic enzymes (1 gene)

YOR241W MET7, required for methionine synthesis and for maintenance of mitochondrial DNA

Other (4 genes)

YER014C-A BUD25, involved in bipolar budding
 YER145C FTR1, iron permease that mediates high-affinity iron uptake
 YGL135W RPL1B, large subunit ribosomal protein L1
 YGR180C RNR4, component of ribonucleotide reductase small subunit

UNKNOWN PROTEINS (21 GENES)

Unknown function (8 genes)

YDR065W RRG1, unknown function
 YGR150C RRG2, unknown function, located in mitochondria
 YJL046W RRG3, unknown function, similarity to lipoate-protein ligase A
 YLL033W RRG4, unknown function
 YLR091W RRG5, unknown function, located in mitochondria
 YMR293C RRG6 (HER2), may be involved in mitochondrial function
 YOR305W RRG7, unknown function, probably mitochondrial
 YPR116W RRG8, unknown function

Questionable ORFs (13 genes)

YBL100C Dubious ORF, overlaps with ATP1
 YCL007C Dubious ORF; overlaps verified ORF YCL005W-A
 YDL068W Dubious ORF, overlaps with CBS1
 YDR114C Dubious ORF, overlaps with YDR115W
 YDR230W Dubious ORF, overlaps with COX20
 YGL218W Dubious ORF, overlaps with MDM34
 YJL120W Dubious ORF, overlaps with RPE1
 YKL169C Dubious ORF, overlaps with MRPL38
 YLR202C Dubious ORF, overlaps with YLR201C and MSS51
 YNL184C Dubious ORF, overlaps with MRPL19
 YOR200W Dubious ORF, overlaps with PET56
 YOR331C Dubious ORF, overlaps with VMA4
 YPR099C Dubious ORF, overlaps with MRPL51

119 *pet* genes found in two of three screens (113 genes excluding questionable ORFs)

KNOWN MITOCHONDRIAL PROTEINS (62 GENES)

Mitochondrial RNA synthesis (2 genes)

YJL209W CBP1, required for COB mRNA stability or 5' processing
 YPL029W SUV3, mitochondrial RNA helicase

Mitochondrial protein synthesis (20 genes)

Mitochondrial ribosomal subunits (13 genes)

YBL038W MRPL16, mitochondrial ribosomal protein
 YBR251W MRPS5, mitochondrial ribosomal protein
 YBR268W MRPL37, mitochondrial ribosomal protein
 YDL202W MRPL11, mitochondrial ribosomal protein
 YDR347W MRP1, mitochondrial ribosomal protein
 YEL050C RML2, mitochondrial ribosomal protein
 YMR188C MRPS17, mitochondrial ribosomal protein
 YNL284C MRPL10, mitochondrial ribosomal protein
 YNR036C Mitochondrial protein, similar to human mitochondrial S12 ribosomal proteins
 YPL118W MRP51, mitochondrial ribosomal protein
 YPL183W-A Possible mitochondrial ribosomal protein

YPR100W MRPL51, mitochondrial ribosomal protein

YPR166C MRP2, mitochondrial ribosomal protein

Mitochondrial tRNA synthetases (2 genes)

YDR268W MSW1, Trp-tRNA synthetase, mitochondrial

YPR047W MSF1, Phe-tRNA synthetase, mitochondrial

Other (5 genes)

YBL080C PET112, required for mitochondrial translation

YDL069C CBS1, translational activator of COB mRNA

YER153C PET122, translational activator required for mitochondrial translation of COX3

YNR045W PET494, translational activator required for mitochondrial translation of COX3

YOL023W IFM1, mitochondrial translation initiation factor 2

Respiratory chain (18 genes)

Succinate dehydrogenase complex (complex II) (2 genes)

YKL148C SDH1, succinate dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein (Fp) subunit

YLL041C SDH2, iron-sulfur protein subunit of succinate dehydrogenase

Cytochrome bc₁ complex (Ubiquinol-cytochrome c reductase complex, complex III) (2 genes)

YDR529C QCR7, ubiquinol cytochrome c reductase subunit 7

YJL166W QCR8, Subunit 8 of ubiquinol cytochrome-c reductase complex

F₀/F₁ ATP synthase (complex V) (2 genes)

YLR295C ATP14, ATP synthase subunit h

YML081C-A ATP18, ATP synthase subunit i (or subunit j)

Assembly factors (12 genes)

YBR037C SCO1, role in copper transport or insertion of copper into cytochrome oxidase

YDR231C COX20, involved in maturation of Cox2p and its assembly into COX

YDR350C ATP22, required for assembly of the F₀ sector of mitochondrial F₁F₀ ATP synthase

YDR375C BCS1, required for expression of functional Rieske iron-sulfur protein

YER058W PET117, involved in assembly of cytochrome oxidase

YER141W COX15, required for cytochrome oxidase assembly

YGR174C CBP4, ubiquinol-cytochrome c reductase assembly factor

YJL003W COX16, required for assembly of cytochrome c oxidase

YKL087C CYT2, holocytochrome-c1 synthase (CC1HL)

YLL009C COX17, copper metallochaperone for cytochrome c oxidase

YLR393W ATP10, required for F₁-F₀ ATP synthase assembly

YML129C COX14, required for assembly of cytochrome oxidase

Mitochondrial enzymes (8 genes)

YFL018C LPD1, dihydrolipoamide dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase complex

YGR255C COQ6, monooxygenase required for coenzyme Q (ubiquinone) biosynthesis

YIL125W KGD1, alpha-Ketoglutarate dehydrogenase

YML110C COQ5, involved in ubiquinone biosynthesis

YML120C NDI1, NADH:ubiquinone oxidoreductase

YOL096C COQ3, catalyzes two different O-methylation steps in ubiquinone biosynthesis

YOR125C CAT5, mitochondrial inner membrane protein involved in ubiquinone biosynthesis

YPL262W FUM1, fumarate hydratase

Lipids biosynthesis, mitochondrial (1 gene)

YOR196C LIP5, lipoic acid synthase (mitochondrial matrix)

Mitochondrial proteases and peptidases (1 gene)

YMR035W IMP2, catalytic subunit of the mitochondrial inner membrane protease Imp

Mitochondrial morphology (3 genes)

YAL010C MDM10, involved in mitochondrial morphology and inheritance

YBR179C FZO1, transmembrane GTPase required for mitochondrial fusion

YOL009C MDM12, mitochondrial morphology and inheritance protein

Other mitochondrial factors (9 genes)

YDL198C YHM1, protein of the mitochondrial carrier (MCF) family

YGL107C RMD9, mitochondrial protein required for sporulation

YJR077C MIR1, phosphate transporter of the mitochondrial carrier (MCF) family

YLR239C LIP2, lipoyl ligase, involved in the modification of mitochondrial enzymes

YLR369W SSQ1, mitochondrial Hsp70 involved in biogenesis of iron-sulfur proteins

YNL003C PET8, mitochondrial carrier (MCF) family

YOL008W COQ10, coenzyme Q binding protein

YPL005W AEP3, stabilizes the bicistronic AAP1-ATP6 mRNA

YPL059W GRX5, mitochondrial protein involved in the synthesis/assembly of iron-sulfur centers

KNOWN NON-MITOCHONDRIAL PROTEINS (44 GENES)

Vacuole (11 genes)

V-ATPase subunits (3 genes)

YGR020C VMA7, V-ATPase 14 kDa subunit of the catalytic (V0) sector

YHR026W PPA1, proteolipid of the V-ATPase

YPR036W VMA13, V-ATPase 54 kDa subunit of V1 sector

V-ATPase assembly (1 gene)

YKL119C VPH2, V-ATPase assembly protein acting in the ER

Vacuolar inheritance and protein sorting factors (7 genes)

YDR323C PEP7, vacuolar segregation protein required for vacuole inheritance

YKL002W DID4, class E vacuolar protein-sorting (vps) factor

YKL054C VID31, involved in vacuolar import and degradation

YLR148W PEP3, vacuolar protein involved in vacuolar protein sorting

YLR240W VPS34, phosphatidylinositol 3-kinase required for vacuolar protein sorting

YLR396C VPS33, vacuolar sorting protein of the Sec1p family

YOR036W PEP12, syntaxin homolog (t-SNARE) involved in Golgi to vacuole transport

Transcription (nuclear) (5 genes)

YBR289W SNF5, component of SWI-SNF global transcription activator complex

YDL056W MBP1, transcription factor that collaborates with Swi6p

YGL115W SNF4, involved in derepression of glucose-repressed genes

YMR021C MAC1, copper-sensing transcription factor

YPL254W HFI1, component of the ADA complex

Non-mitochondrial metabolic enzymes (4 genes)

YAL012W CYS3, cystathionine gamma-lyase

YGR155W CYS4, cystathionine beta-synthase

YJL101C GSH1, gamma-glutamylcysteine synthetase

YLR377C FBP1, fructose-1,6-bisphosphatase

Other (24 genes)

YAL009W SPO7, ER membrane protein of unknown function

YAL016W TPD3, protein serine/threonine phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunit A

YAL047C SPC72, component of the cytoplasmic plaque of the spindle pole body

YDR195W REF2, involved in mRNA 3'-end formation prior to polyadenylation

YDR270W CCC2, copper-transporting P-type ATPase

YDR364C CDC40, pre-mRNA splicing factor

YDR477W SNF1, serine/threonine protein kinase, for derepression of glucose-repressed genes

YER070W RNR1, ribonucleosid-diphosphate-reductase, large (R1) subunit

YGL206C CHC1, clathrin heavy chain

YGL240W DOC1, anaphase promoting complex (APC10)

YGL244W RTF1, pol II transcription elongation factor, regulates DNA binding properties of TBP

YGR167W CLC1, clathrin light chain

YIL018W RPL2B, ribosomal protein L2

YIL036W CST6, similarity to Mei4p and to cAMP response element binding proteins

YJL121C RPE1, ribulose-5-phosphate 3-epimerase

YJR040W GEF1, voltage-gated chloride channel

YJR090C GRR1, F-box protein required for glucose repression

YKL040C NFU1, homeostasis of metal ions, Nifu-like protein (NUB1)

YLR270W DCS1, non-essential hydrolase involved in mRNA decapping

YLR337C VRP1, involved in cytoskeletal organization and cytokinesis

YMR058W FET3, cell surface ferroxidase

YNL138W SRV2, adenylate cyclase-associated protein

YPL031C PHO85, cyclin-dependent kinase

YPR124W CTR1, copper transport protein

UNKNOWN PROTEINS (13 GENES)

Unknown function (7 genes)

YBR163W Unknown function

YDR332W Unknown function

YGR102C Unknown function, located in mitochondria

YMR066W Unknown function, located in mitochondria

YOL071W	Unknown function
YOR205C	Unknown function, located in mitochondria
YOR350C	Unknown function, similar to <i>Lucilia illustris</i> mitochondrial cytochrome oxidase

Questionable ORFs (6 genes)

YGR219W	Dubious ORF, overlaps with MRPL9
YKL118W	Dubious ORF, overlaps with VPH2
YMR151W	Dubious ORF, overlaps with IMP1
YNL170W	Dubious ORF, overlaps with PSD1
YNR042W	Dubious ORF, overlaps with COQ2
YPR123C	Dubious ORF, overlaps with CTR1

KNOWN NON-MITOCHONDRIAL PROTEINS (123 GENES)**Vacuole (7 genes)**Vacuolar inheritance and protein sorting factors (7 genes)

YDL077C	VAM6, Vacuolar protein, tethers steps of vacuolar membrane fusion
YDR027C	LUV1, Vps52p-Vps53p-Vps54p complex, involved in protein sorting in the Golgi
YDR495C	VPS3, required for the sorting and processing of soluble vacuolar proteins
YJL029C	VPS53, subunit of the Vps52p-Vps53p-Vps54p complex
YGL095C	VPS45, Sec1p family of vacuolar protein sorting
YKR001C	VPS1, vacuolar sorting protein, member of the dynamin family of GTPases
YLL040C	VPS13, involved in vacuolar sorting

Lipids biosynthesis, non-mitochondrial or unspecified (2 genes)

YLR056W	ERG3, C-5 sterol desaturase (microsomal membrane)
YMR015C	ERG5, C-22 sterol desaturase

Transcription (nuclear) (7 genes)

YBR112C	SSN6, general repressor of RNA polymerase II transcription
YCR084C	TUP1, repressor of RNA polymerase II transcription
YER068W	MOT2 (SIG1), zinc finger transcriptional repressor
YHL025W	SNF6, component of SWI-SNF global transcription activator complex
YIL154C	IMP2, transcriptional activator involved in maintenance of ion homeostasis
YMR280C	CAT8, transcription factor required for derepression of gluconeogenic enzymes
YOR290C	SNF2, component of SWI-SNF global transcription activator complex

Non-mitochondrial metabolic enzymes (1 gene)

YNL117W	MLS1, malate synthase, enzyme of the glyoxylate cycle
---------	---

Other (106 genes)

YAL013w	DEP1, transcriptional modulator
YAL026C	DRS2, maintains membrane lipid asymmetry in post-Golgi secretory vesicles
YBL002W	HTB2, histone H2B subtype
YBL007C	SLA1, involved in assembly of cortical actin cytoskeleton
YBL019W	APN2, class II abasic (AP) endonuclease; repair of DNA damage; homolog of hHAP1
YBL031W	SHE1 cytoskeletal protein of unknown function; overexpression causes growth arrest
YBL032W	HEK2, RNA binding protein; localizes ASH1 mRNA
YBL036C	non-specific single-domain racemase
YBL046W	PSY4, regulatory subunit of a protein phosphatase complex (nuclear)
YBL057C	PTH2, negatively regulates the ubiquitin-proteasome pathway
YBL082C	ALG3, alpha(1-3) mannosyltransferase
YBL093C	ROX3, RNA polymerase II holoenzyme component
YBR035C	PDX3, pyridoxine (pyridoxamine) phosphate oxidase
YBR036C	CSG2, endoplasmic reticulum membrane protein
YBR128C	ATG14, subunit of an autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex
YBR283C	SSH1, involved in co-translational protein translocation in the ER
YCL010C	SGF29, probable 29kDa Subunit of SAGA histone acetyltransferase complex
YCR009C	RVS161, roles in endocytosis and in cell fusion
YCR020W-B	HTL1, subunit of the RSC chromatin remodeling complex
YDL033C	SLM3, tRNA-specific 2-thiouridylase
YDL074C	BRE1, E3 ubiquitin ligase for Rad6p
YDL091C	UBX3, UBX domain-containing protein that interacts with Cdc48p
YDL099W	BUG1, involved in ER to Golgi transport
YDL113C	ATG20, involved in localization of membranes to the preautophagosome
YDL135C	RDI1, Rho GDP dissociation inhibitor

YDL146W	LDB17, unknown function
YDL160C	DHH1, cytoplasmic DExD/H-box helicase
YDL192W	ARF1, GTPase of the Ras superfamily involved in coated vesicles formation
YDR006C	SOK1, involved in cAMP-mediated signaling; localized to the nucleus
YDR025W	RPS11A, component of the small (40S) ribosomal subunit
YDR069C	DOA4, ubiquitin-specific protease
YDR078C	SHU2, involved in homologous recombination repair
YDR129C	SAC6, actin filament bundling protein, fimbrin; essential for polarized secretion
YDR173C	ARG82, Inositol polyphosphate multikinase (IPMK)
YDR264C	AKR1, palmitoyl transferase involved in protein palmitoylation
YDR283C	GCN2, protein kinase
YDR295C	HDA2, class II histone deacetylase complex
YDR349C	YPS7, putative GPI-anchored aspartic protease
YDR378C	LSM6, possibly involved in processing tRNA, snoRNA, and rRNA
YDR392W	SPT3, SAGA-like transcriptional regulatory complex
YDR448W	ADA2, component of the histone acetyltransferase complexes
YDR507C	GIN4, serine/threonine-protein kinase required for septin organization at the bud neck
YDR518W	EUG1, protein disulfide isomerase
YDR523C	SPS1, putative protein serine/threonine kinase
YDR533C	HSP 38, possible chaperone and cysteine protease
YEL029C	BUD16, involved in bud-site selection and telomere maintenance
YEL044W	IES6, associates with the INO80 chromatin remodeling complex
YER028C	MIG3, probable transcriptional repressor
YER103W	SSA4, heat shock protein that is highly induced upon stress
YER110C	KAP123, karyopherin beta
YER114C	BOI2, protein implicated in polar growth, functionally redundant with Boi1p
YER122C	GLO3, GTPase-activating protein (GAP) for ADP-ribosylation factors
YER131W	RPS26B, component of the small (40S) ribosomal subunit
YER155C	BEM2, Rho GTPase activating protein; control of cytoskeleton organization
YER169W	RPH1, transcriptional repressor of PHR1
YFR019W	FAB1, involved in orientation or separation of mitotic chromosomes
YGL017W	ATE1, arginyl-tRNA-protein transferase
YGL025C	PGD1, component of RNA polymerase II holoenzyme
YGL038C	OCH1, alpha-1,6-mannosyltransferase
YGL246C	RAI1, nuclear protein required for pre-rRNA processing
YGL251C	HFM1, meiosis specific DNA helicase
YGR262C	BUD32, may be involved in polar bud-site selection
YHR006W	STP2, transcription factor; activates transcription of amino acid permease genes
YIL008W	URM1, ubiquitin-like protein with only weak sequence similarity to ubiquitin
YIL047C	SYG1, member of the divalent anion:Na ⁺ (DASS) family of membrane transporters
YJL052W	TDH1, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isozyme 1
YJL124C	LSM1, involved in degradation of cytoplasmic mRNAs
YJR004C	SAG1, alpha-agglutinin of alpha-cells
YJR104C	SOD1, cytosolic superoxide dismutase
YKL081W	TEF4, translation elongation factor EF-1 gamma
YKL114C	APN1, major apurinic/apyrimidinic endonuclease, repair of DNA damage
YKL212W	SAC1, lipid phosphoinositide phosphatase of the ER and Golgi
YLL042C	ATG10, E2-like conjugating enzyme, involved in autophagy
YLR025W	SNF7, endosomal sorting complex
YLR070C	XYL2, xylitol dehydrogenase, converts xylitol to D-xylulose
YLR114C	AVL9, involved in exocytic transport from the Golgi
YLR144C	ACF2, beta-1,3-endoglucanase; probable role in cortical actin cytoskeleton assembly
YLR234W	TOP3, DNA topoisomerase III
YLR350W	ORM2, human ortholog is located in the endoplasmic reticulum
YLR394W	CST9, SUMO E3 ligase; required for synaptonemal complex formation
YML088W	UFO1, F-box protein, subunit of the Skp1-Cdc53-F-box (SCF) E3 ubiquitin ligase
YML094W	GIM5, prefoldin subunit 5, component of the Gim protein complex
YML112W	CTK3, C-terminal domain (RNA polymerase II CTD) kinase gamma subunit
YMR070W	MOT3, nuclear transcription factor; e.g. repression of ergosterol biosynthetic genes
YMR071C	TVP18, integral membrane protein localized to late Golgi vesicles
YMR077C	VPS20, myristoylated subunit of the endosomal sorting complex
YMR138W	CIN4, GTP-binding protein involved in chromosome segregation

YMR263W	SAP30, subunit of a histone deacetylase complex
YNL064C	YDJ1, involved in protein import into mitochondria and ER
YNL084C	END3, EH domain-containing protein involved in endocytosis
YNL159C	ASI2, integral inner nuclear membrane protein
YNL160W	YGP1, cell wall-related secretory glycoprotein
YNL225C	CNM67, component of the spindle pole body outer plaque
YNL297C	MON2, role in endocytosis and vacuole integrity
YOL001W	PHO80, cyclin that interacts with Pho85p protein kinase
YOL004W	SIN3, component of the Sin3p-Rpd3p histone deacetylase complex
YOL051W	GAL11, component of RNA polymerase II holoenzyme
YOL100W	PKH2, serine/threonine protein kinase involved in endocytosis
YOL148C	SPT20, component of the nucleosomal histone acetyltransferase
YOR127W	RGA1, GTPase-activating protein for Cdc42p
YOR141C	ARP8, nuclear actin-related protein involved in chromatin remodeling
YOR155C	ISN1, inosine 5'-monophosphate (IMP)-specific 5'-nucleotidase, breakdown of IMP
YOR375C	GDH1, NADP(+)-dependent glutamate dehydrogenase
YOR380W	RDR1, transcriptional repressor, control of multidrug resistance
YPL174C	NIP100, mitotic spindle positioning protein
YPL268W	PLC1, phosphoinositide-specific phospholipase C
YPR066W	UBA3, Rub1-activating enzyme, similar to ubiquitin-activating E1 protein
YPR072W	NOT5, subunit of the CCR4-NOT complex, which is a global transcriptional regulator

UNKNOWN PROTEINS (68 GENES)

Unknown function (46 genes)

YBL044W	Unknown function
YCL001W-A	Unknown function
YCR004C	Unknown function, located in mitochondria
YDL012C	Plasma membrane protein of unknown function
YDL049C	Unknown function
YDL063C	Unknown function
YDL104C	Putative metalloprotease
YDL114W	Putative protein of unknown function with similarity to acyl-carrier-protein reductases
YDL119C	Unknown function, located in mitochondria
YDL129W	Unknown function
YDL133W	Unknown function
YDL157C	Unknown function; detected in highly purified mitochondria in high-throughput studies
YDL167C	Unknown function
YDR042C	Unknown function
YDR316W	Protein integral to the mitochondrial membrane
YDR458C	Unknown function; GFP-fusion protein in nuclear periphery
YDR512C	Unknown function
YER077C	Unknown function
YGL220W	Unknown function
YGR243W	Unknown function, localized to mitochondria
YHR009C	Unknown function
YHR039C	Unknown function, GFP-fusion protein in endoplasmic reticulum
YHR059W	Unknown function
YIL015C-A	Unknown function
YIL060W	Unknown function, 100% identical with YHR145C
YJL023C	PET130, protein is detected in highly purified mitochondria in high-throughput studies
YJL184W	Unknown function
YJR120W	Unknown function
YLR125W	Unknown function
YLR149C	Unknown function
YLR218C	Unknown function
YML072C	Unknown function, contains three calcium and lipid binding domains
YML087C	Unknown function
YMR063W	Unknown function
YMR067C	UBX4, UBX domain-containing protein, unknown function
YMR084W	Unknown function
YMR184W	Unknown function
YMR244C-A	Unknown function

YNL080C	Unknown function
YOL083W	Unknown function
YOL138C	Unknown function

Questionable ORFs (22 genes)

YBL012C	Dubious ORF, overlaps with SCT1
YBL053W	Dubious ORF, overlaps with SAS3
YBL062W	Dubious ORF, overlaps with SKT5
YDL032W	Dubious ORF, overlaps with YDL033C and DBP10 promoter
YDL062W	Dubious ORF, overlaps uncharacterized ORF YDL063C
YDR010C	Dubious ORF
YDR269C	Dubious ORF, overlaps with CCC2
YDR271C	Dubious ORF, overlaps with CCC2
YDR491C	Dubious ORF, overlaps with IZH1
YGL165C	Dubious ORF, overlaps with CUP2
YHL005C	Dubious ORF, overlaps with MRP4 promoter
YHR049C-A	Dubious ORF
YJL022W	Dubious ORF, overlaps with PET130
YJL175W	Dubious ORF, overlaps with SWI3
YJR087W	Dubious ORF, overlaps the gene STE18 and uncharacterized ORF YJR088C
YLR294C	Dubious ORF, overlaps with ATP14
YMR245W	Dubious ORF
YNR025C	Dubious ORF, overlaps with YNR024w
YOR199W	Dubious ORF, overlaps with MRM1
YOR318C	Dubious ORF unlikely to encode a protein
YOR333C	Dubious ORF, overlaps with MRS2
YPL136W	Dubious ORF, overlaps with GIP3

19 additional *PET* genes (deletion mutants were not present in all three libraries)**6 *PET* genes found in two of two screens**

YDR388W	RVS167, actin-associated protein, homolog of mammalian amphiphysin
YDR405W	MRP20, mitochondrial ribosomal protein
YFL036W	RPO41, RNA polymerase, mitochondrial
YKL194C	MST1, mitochondrial threonyl tRNA synthase
YNL213C	RRG9, unknown function, located in mitochondria
YOL143C	RIB4, riboflavin biosynthesis pathway enzyme

6 *PET* genes found in one of one screens

YBR039W	ATP3, gamma subunit of the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase
YBR122C	MRPL36, mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YJL062W-A	RRG10, unknown function, GFP-fusion protein localizes to the mitochondria
YMR231W	PEP5, vacuolar protein required for vacuole biogenesis
YNL185C	MRPL19, mitochondrial ribosomal protein
YPL189C-A	COA2, cytochrome c oxidase assembly factor

7 *PET* genes found in one of two screens

YBR097W	VPS15, serine/threonine protein kinase involved in vacuolar protein sorting
YDL039C	PRM7, pheromone-regulated protein
YDL057W	Unknown function
YDL181W	INH1, inhibits ATP hydrolysis by the F1F0-ATP synthase
YEL059C-A	SOM1, subunit of the mitochondrial inner membrane peptidase, maturation of proteins
YER014W	HEM14, protoporphyrinogen oxidase
YGL024W	Dubious ORF, overlaps with PGD1

224 *pet* genes found in one of three screens (202 genes excluding questionable ORFs)**KNOWN MITOCHONDRIAL PROTEINS (33 GENES)****Mitochondrial RNA synthesis (3 genes)**

YGL064C	MRH4, mitochondrial RNA helicase
YKL208W	CBT1, required for 3' end processing of the mitochondrial COB mRNA
YPR134W	MSS18, involved in splicing a15beta intron of the mitochondrial COX1 transcript

Mitochondrial protein synthesis (11 genes)Mitochondrial ribosomal subunits (8 genes)

YBR146W	MRPS9, mitochondrial ribosomal protein
YDR116C	MRPL1, mitochondrial ribosomal protein
YDR322W	MRPL35, mitochondrial ribosomal subunit
YDR462W	MRPL28, mitochondrial ribosomal protein
YGR165W	MRPS35, mitochondrial ribosomal protein
YIL093C	RSM53, mitochondrial ribosome small subunit
YKL167C	MRP49, mitochondrial ribosomal protein
YMR024W	MRPL3, mitochondrial ribosomal protein

Mitochondrial tRNA synthetases (1 gene)

YPL040C	ISM1, isoleucyl-tRNA synthetase, mitochondrial
---------	--

Other (2 genes)

YBR120C	CBP6, required for translation of the mitochondrial COB mRNA
YOR201C	PET56, ribose methyltransferase for mitochondrial 21S rRNA

Respiratory chain (3 genes)Cytochrome bc₁ complex (Ubiquinol-cytochrome c reductase complex, complex III) (1 gene)

YGR183C	QCR9, ubiquinol cytochrome c reductase subunit 9
---------	--

Assembly factors (2 genes)

YIL157C	COA1, required for assembly of the cytochrome c oxidase complex
YJR034W	PET191, involved in assembly of cytochrome oxidase
YKL137W	CMC1, conserved copper binding protein of the mitochondrial inner membrane
YNR020C	ATP23, metalloprotease required for processing of Atp6
YOR037W	CYC2, mitochondrial protein, likely participates in ligation of heme to cytochrome c

Mitochondrial enzymes (3 genes)

YDR226W	ADK1, adenylate kinase, cytoplasmic and mitochondrial
YHR008C	SOD2, manganese superoxide dismutase, mitochondrial
YMR083W	ADH3, mitochondrial alcohol dehydrogenase isozyme III

Lipids biosynthesis, mitochondrial (1 gene)

YMR207C	HFA1, mitochondrial acetyl-coenzyme A carboxylase, fatty acid biosynthesis
---------	--

Mitochondrial proteases and peptidases (2 genes)

YBL022C	PIM1, mitochondrial ATP-dependent protease
YGR101W	PCP1, mitochondrial serine protease, processing of various mitochondrial proteins

Mitochondrial morphology (5 genes)

YAL048C	GEM1, GTPase which regulates mitochondrial morphology
YHR194W	MDM31, inner membrane protein required for normal mitochondrial morphology
YLL006W	MMM1, essential for maintenance of mitochondrial shape and structure
YOL027C	MDM38, mitochondrial Distribution and Morphology
YOR147W	MDM32, inner membrane protein required for normal mitochondrial morphology

Other mitochondrial factors (5 genes)

YGR257C	MTM1, mitochondrial carrier family (MCF) of membrane transporters
YLR204W	QRI5, mitochondrial protein of unknown function
YMR060C	TOM37, mitochondrial outer membrane sorting and assembly machinery complex
YPL060W	LPE10, mitochondrial inner membrane magnesium transporter
YPL188W	POS5, mitochondrial NADH kinase; required for the response to oxidative stress

KNOWN NON-MITOCHONDRIAL PROTEINS (123 GENES)**Vacuole (7 genes)**Vacuolar inheritance and protein sorting factors (7 genes)

YDL077C	VAM6, Vacuolar protein, tethers steps of vacuolar membrane fusion
YDR027C	LUV1, Vps52p-Vps53p-Vps54p complex, involved in protein sorting in the Golgi
YDR495C	VPS3, required for the sorting and processing of soluble vacuolar proteins
YJL029C	VPS53, subunit of the Vps52p-Vps53p-Vps54p complex
YGL095C	VPS45, Sec1p family of vacuolar protein sorting
YKR001C	VPS1, vacuolar sorting protein, member of the dynamin family of GTPases
YLL040C	VPS13, involved in vacuolar sorting

Lipids biosynthesis, non-mitochondrial or unspecified (2 genes)

YLR056W	ERG3, C-5 sterol desaturase (microsomal membrane)
YMR015C	ERG5, C-22 sterol desaturase

Transcription (nuclear) (7 genes)

YBR112C	SSN6, general repressor of RNA polymerase II transcription
YCR084C	TUP1, repressor of RNA polymerase II transcription
YER068W	MOT2 (SIG1), zinc finger transcriptional repressor
YHL025W	SNF6, component of SWI-SNF global transcription activator complex
YIL154C	IMP2, transcriptional activator involved in maintenance of ion homeostasis
YMR280C	CAT8, transcription factor required for derepression of gluconeogenic enzymes
YOR290C	SNF2, component of SWI-SNF global transcription activator complex

Non-mitochondrial metabolic enzymes (1 gene)

YNL117W	MLS1, malate synthase, enzyme of the glyoxylate cycle
---------	---

Other (106 genes)

YAL013w	DEP1, transcriptional modulator
YAL026C	DRS2, maintains membrane lipid asymmetry in post-Golgi secretory vesicles
YBL002W	HTB2, histone H2B subtype
YBL007C	SLA1, involved in assembly of cortical actin cytoskeleton
YBL019W	APN2, class II abasic (AP) endonuclease; repair of DNA damage; homolog of hHAP1
YBL031W	SHE1 cytoskeletal protein of unknown function; overexpression causes growth arrest
YBL032W	HEK2, RNA binding protein; localizes ASH1 mRNA
YBL036C	non-specific single-domain racemase
YBL046W	PSY4, regulatory subunit of a protein phosphatase complex (nuclear)
YBL057C	PTH2, negatively regulates the ubiquitin-proteasome pathway
YBL082C	ALG3, alpha(1-3) mannosyltransferase
YBL093C	ROX3, RNA polymerase II holoenzyme component
YBR035C	PDX3, pyridoxine (pyridoxamine) phosphate oxidase
YBR036C	CSG2, endoplasmic reticulum membrane protein
YBR128C	ATG14, subunit of an autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex
YBR283C	SSH1, involved in co-translational protein translocation in the ER
YCL010C	SGF29, probable 29kDa Subunit of SAGA histone acetyltransferase complex
YCR009C	RVS161, roles in endocytosis and in cell fusion
YCR020W-B	HTL1, subunit of the RSC chromatin remodeling complex
YDL033C	SLM3, tRNA-specific 2-thiouridylase
YDL074C	BRE1, E3 ubiquitin ligase for Rad6p
YDL091C	UBX3, UBX domain-containing protein that interacts with Cdc48p
YDL113C	ATG20, involved in localization of membranes to the preautophagosome
YDL135C	RDI1, Rho GDP dissociation inhibitor
YDL146W	LDB17, unknown function
YDL160C	DHH1, cytoplasmic DExD/H-box helicase
YDL192W	ARF1, GTPase of the Ras superfamily involved in coated vesicles formation
YDR006C	SOK1, involved in cAMP-mediated signaling; localized to the nucleus
YDR025W	RPS11A, component of the small (40S) ribosomal subunit
YDR069C	DOA4, ubiquitin-specific protease
YDR129C	SAC6, actin filament bundling protein, fimbrin; essential for polarized secretion
YDR173C	ARG82, Inositol polyphosphate multikinase (IPMK)
YDR264C	AKR1, palmitoyl transferase involved in protein palmitoylation
YDR283C	GCN2, protein kinase
YDR295C	HDA2, class II histone deacetylase complex
YDR349C	YPS7, putative GPI-anchored aspartic protease
YDR378C	LSM6, possibly involved in processing tRNA, snoRNA, and rRNA
YDR392W	SPT3, SAGA-like transcriptional regulatory complex
YDR448W	ADA2, component of the histone acetyltransferase complexes
YDR507C	GIN4, serine/threonine-protein kinase required for septin organization at the bud neck
YDR518W	EUG1, protein disulfide isomerase
YDR523C	SPS1, putative protein serine/threonine kinase
YDR533C	HSP 38, possible chaperone and cysteine protease
YEL029C	BUD16, involved in bud-site selection and telomere maintenance
YEL044W	IES6, associates with the INO80 chromatin remodeling complex
YER028C	MIG3, probable transcriptional repressor
YER103W	SSA4, heat shock protein that is highly induced upon stress
YER110C	KAP123, karyopherin beta
YER114C	BOI2, protein implicated in polar growth, functionally redundant with Boi1p
YER122C	GLO3, GTPase-activating protein (GAP) for ADP-ribosylation factors

YER131W	RPS26B, component of the small (40S) ribosomal subunit
YER155C	BEM2, Rho GTPase activating protein; control of cytoskeleton organization
YER169W	RPH1, transcriptional repressor of PHR1
YFR019W	FAB1, involved in orientation or separation of mitotic chromosomes
YGL017W	ATE1, arginyl-tRNA-protein transferase
YGL025C	PGD1, component of RNA polymerase II holoenzyme
YGL038C	OCH1, alpha-1,6-mannosyltransferase
YGL246C	RAI1, nuclear protein required for pre-rRNA processing
YGL251C	HFM1, meiosis specific DNA helicase
YGR262C	BUD32, may be involved in polar bud-site selection
YHR006W	STP2, transcription factor; activates transcription of amino acid permease genes
YIL008W	URM1, ubiquitin-like protein with only weak sequence similarity to ubiquitin
YIL047C	SYG1, member of the divalent anion:Na ⁺ (DASS) family of membrane transporters
YJL052W	TDH1, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isozyme 1
YJL124C	LSM1, involved in degradation of cytoplasmic mRNAs
YJR004C	SAG1, alpha-agglutinin of alpha-cells
YJR104C	SOD1, cytosolic superoxide dismutase
YKL081W	TEF4, translation elongation factor EF-1 gamma
YKL114C	APN1, major apurinic/apyrimidinic endonuclease, repair of DNA damage
YKL212W	SAC1, lipid phosphoinositide phosphatase of the ER and Golgi
YLL042C	ATG10, E2-like conjugating enzyme, involved in autophagy
YLR025W	SNF7, endosomal sorting complex
YLR070C	XYL2, xylitol dehydrogenase, converts xylitol to D-xylulose
YLR114C	AVL9, involved in exocytic transport from the Golgi
YLR144C	ACF2, beta-1,3-endoglucanase; probable role in cortical actin cytoskeleton assembly
YLR234W	TOP3, DNA topoisomerase III
YLR350W	ORM2, human ortholog is located in the endoplasmic reticulum
YLR394W	CST9, SUMO E3 ligase; required for synaptonemal complex formation
YML088W	UFO1, F-box protein, subunit of the Skp1-Cdc53-F-box (SCF) E3 ubiquitin ligase
YML094W	GIM5, prefoldin subunit 5, component of the Gim protein complex
YML112W	CTK3, C-terminal domain (RNA polymerase II CTD) kinase gamma subunit
YMR070W	MOT3, nuclear transcription factor; e.g. repression of ergosterol biosynthetic genes
YMR071C	TVP18, integral membrane protein localized to late Golgi vesicles
YMR077C	VPS20, myristoylated subunit of the endosomal sorting complex
YMR138W	CIN4, GTP-binding protein involved in chromosome segregation
YMR263W	SAP30, subunit of a histone deacetylase complex
YNL064C	YDJ1, involved in protein import into mitochondria and ER
YNL084C	END3, EH domain-containing protein involved in endocytosis
YNL159C	ASI2, integral inner nuclear membrane protein
YNL160W	YGP1, cell wall-related secretory glycoprotein
YNL225C	CNM67, component of the spindle pole body outer plaque
YNL297C	MON2, role in endocytosis and vacuole integrity
YOL001W	PHO80, cyclin that interacts with Pho85p protein kinase
YOL004W	SIN3, component of the Sin3p-Rpd3p histone deacetylase complex
YOL051W	GAL11, component of RNA polymerase II holoenzyme
YOL100W	PKH2, serine/threonine protein kinase involved in endocytosis
YOL148C	SPT20, component of the nucleosomal histone acetyltransferase
YOR127W	RGA1, GTPase-activating protein for Cdc42p
YOR141C	ARP8, nuclear actin-related protein involved in chromatin remodeling
YOR155C	ISN1, inosine 5'-monophosphate (IMP)-specific 5'-nucleotidase, breakdown of IMP
YOR375C	GDH1, NADP(+)-dependent glutamate dehydrogenase
YOR380W	RDR1, transcriptional repressor, control of multidrug resistance
YPL174C	NIP100, mitotic spindle positioning protein
YPL268W	PLC1, phosphoinositide-specific phospholipase C
YPR066W	UBA3, Rub1-activating enzyme, similar to ubiquitin-activating E1 protein
YPR072W	NOT5, subunit of the CCR4-NOT complex, which is a global transcriptional regulator

UNKNOWN PROTEINS (68 GENES)

Unknown function (46 genes)

YBL044W	Unknown function
YCL001W-A	Unknown function
YCR004C	Unknown function, located in mitochondria

YDL012C	Plasma membrane protein of unknown function
YDL049C	Unknown function
YDL063C	Unknown function
YDL104C	Putative metalloprotease
YDL114W	Putative protein of unknown function with similarity to acyl-carrier-protein reductases
YDL119C	Unknown function, located in mitochondria
YDL129W	Unknown function
YDL133W	Unknown function
YDL157C	Unknown function; detected in highly purified mitochondria in high-throughput studies
YDL167C	Unknown function
YDR042C	Unknown function
YDR316W	Protein integral to the mitochondrial membrane
YDR458C	Unknown function; GFP-fusion protein in nuclear periphery
YDR512C	Unknown function
YER077C	Unknown function
YGL220W	Unknown function
YGR243W	Unknown function, localized to mitochondria
YHR009C	Unknown function
YHR039C	Unknown function, GFP-fusion protein in endoplasmic reticulum
YHR059W	Unknown function
YIL015C-A	Unknown function
YIL060W	Unknown function, 100% identical with YHR145C
YJL023C	PET130, protein is detected in highly purified mitochondria in high-throughput studies
YJL184W	Unknown function
YJR120W	Unknown function
YLR125W	Unknown function
YLR149C	Unknown function
YLR218C	Unknown function
YML072C	Unknown function, contains three calcium and lipid binding domains
YML087C	Unknown function
YMR063W	Unknown function
YMR067C	UBX4, UBX domain-containing protein, unknown function
YMR084W	Unknown function
YMR184W	Unknown function
YMR244C-A	Unknown function
YNL080C	Unknown function
YOL083W	Unknown function
YOL138C	Unknown function

Questionable ORFs (22 genes)

YBL012C	Dubious ORF, overlaps with SCT1
YBL053W	Dubious ORF, overlaps with SAS3
YBL062W	Dubious ORF, overlaps with SKT5
YDL032W	Dubious ORF, overlaps with YDL033C and DBP10 promoter
YDL062W	Dubious ORF, overlaps uncharacterized ORF YDL063C
YDR010C	Dubious ORF
YDR269C	Dubious ORF, overlaps with CCC2
YDR271C	Dubious ORF, overlaps with CCC2
YDR491C	Dubious ORF, overlaps with IZH1
YGL165C	Dubious ORF, overlaps with CUP2
YHL005C	Dubious ORF, overlaps with MRP4 promoter
YHR049C-A	Dubious ORF
YJL022W	Dubious ORF, overlaps with PET130
YJL175W	Dubious ORF, overlaps with SWI3
YJR087W	Dubious ORF, overlaps the gene STE18 and uncharacterized ORF YJR088C
YLR294C	Dubious ORF, overlaps with ATP14
YMR245W	Dubious ORF
YNR025C	Dubious ORF, overlaps with YNR024w
YOR199W	Dubious ORF, overlaps with MRM1
YOR318C	Dubious ORF unlikely to encode a protein
YOR333C	Dubious ORF, overlaps with MRS2
YPL136W	Dubious ORF, overlaps with GIP3

Tabelle A3. Verschiedene Klassen an *pet*-Genen. Die Liste enthält systematische und Standardnamen der Gene (entnommen aus Merz & Westermann, zur Publikation eingereicht).

Class I *pet* mutants

YAL039C/CYC3	YGR167W/CLC1	YMR089C/YTA12
YBL019W/APN2	YGR171C/MSM1	YMR098C
YBL021C/HAP3	YGR215W/RSM27	YMR158W/MRPS8
YBL080C/PET112	YHL038C/CBP2	YMR188C/MRPS17
YBL090W/MRP21	YHR011W/DIA4	YMR193W/MRPL24
YBR039W/ATP3	YHR038W/RRF1	YMR228W/MTF1
YBR146W/MRPS9	YHR091C/MSR1	YMR267W/PPA2
YBR179C/FZO1	YHR120W/MSH1	YMR282C/AEP2
YBR251W/MRPS5	YHR147C/MRPL6	YMR287C/DSS1
YBR268W/MRPL37	YHR168W/MTG2	YMR293C/RRG6
YBR282W/MRPL27	YJL063C/MRPL8	(HER2)
YCR003W/MRPL32	YJL096W/MRPL49	YNL073W/MSK1
YCR024C/SLM5	YJL102W/MEF2	YNL081C/SWS2
YCR071C/IMG2	YJR144W/MGM101	YNL177C/MRPL22
YDL044C/MTF2	YKL003C/MRP17	YNL184C
YDL045W-A/MRP10	YKL114C/APN1	YNL185C/MRPL19
YDL129W	YKL134C/OCT1	YNL213C/RRG9
YDL133W	YKL138C/MRPL31	YNL252C/MRPL17
YDR065W/RRG1	YKL155C/RSM22	YNR037C/RSM19
YDR079W/PET100	YKL169C	YOL009C/MDM12
YDR114C	YKL170W/MRPL38	YOL033W/MSE1
YDR115W	YKL194C/MST1	YOL083W
YDR175C/RSM24	YKR006C/MRPL13	YOL095C/HMI1
YDR194C/MSS116	YLL027W/ISA1	YOR150W/MRPL23
YDR296W/MHR1	YLL033W/RRG4	YOR158W/PET123
YDR337W/MRPS28	(IRC19)	YOR187W/TUF1
YDR347W/MRP1	YLR067C/PET309	YOR211C/MGM1
YDR350C/ATP22	YLR069C/MEF1	YOR241W/MET7
YDR377W/ATP17	YLR070C/XYL2	YOR330C/MIP1
YEL050C/RML2	YLR091W/RRG5	YOR375C/GDH1
YER050C/RSM18	YLR139C/SLS1	YPL013C/MRPS16
YER070W/RNR1	YLR295C/ATP14	YPL078C/ATP4
YER154W/OXA1	YLR304C/ACO1	YPL097W/MSY1
YFL016C/MDJ1	YLR312W-A/MRPL15	YPL104W/MSD1
YGL129C/RSM23	YLR369W/SSQ1	YPL148C/PPT2
YGL143C/MRF1	YLR382C/NAM2	YPL173W/MRPL40
YGL240W/DOC1	YLR439W/MRPL4	YPL254W/HFI1
YGR076C/MRPL25	YML061C/PIF1	YPL271W/ATP15
YGR102C	YMR015C/ERG5	YPR067W/ISA2
YGR150C/RRG2	YMR064W/AEP1	YPR116W/RRG8

Class II *pet* mutants

YDL033C/SLM3	YGL070C/RPB9	YML110C/COQ5
YDL099W/BUG1	YJL003W/COX16	YOL008W/COQ10
YDL107W/MSS2	YKL040C/NFU1	YOL051W/GAL11
YDL114W	YKL080W/VMA5	YOR200W
YDR270W/CCC2	YKL109W/HAP4	YOR221C/MCT1
YDR364C/CDC40	YLL018C-A/COX19	YOR305W/RRG7
YDR458C/HEH2	YLR294C	YPL172C/COX10
YEL059C-A/SOM1	YLR337C/VRP1	

Class III *pet* mutants

YAL009W/SPO7	YER145C/FTR1	YLR203C/MSS51
YAL010C/MDM10	YGL071W/RCS1	YLR447C/VMA6
YAL013W/DEP1	YGL237C/HAP2	YML120C/NDI1
YAL044C/GCV3	YGL244W/RTF1	YMR021C/MAC1
YBL045C/COR1	YGL251C/HFM1	YMR035W/IMP2
YBL082C/ALG3	YGR020C/VMA7	YMR097C/MTG1
YBL093C/ROX3	YGR062C/COX18	YMR150C/IMP1
YBL099W/ATP1	YGR105W/VMA21	YMR151W/YIM2
YBL100C	YGR112W/SHY1	YMR256C/COX7
YBR003W/COQ1	YGR155W/CYS4	YMR257C/PET111
YBR026C/ETR1	YGR220C/MRPL9	YMR286W/MRPL33
YBR097W/VPS15	YGR222W/PET54	YNL005C/MRP7
YBR127C/VMA2	YGR262C/BUD32	YNL052W/COX5A
YBR283C/SSH1	YHR026W/PPA1	YNL138W/SRV2
YBR289W/SNF5	YHR039C/MSC7	YNL170W
YCL001W-A	YHR039C-B/VMA10	YNL315C/ATP11
YCL007C	YHR049C-A	YNR020C/ATP23
YCR020W-B/HTL1	YHR051W/COX6	YNR041C/COQ2
YCR046C/IMG1	YHR060W/VMA22	YNR042W
YDL039C/PRM7	YHR067W/HTD2	YNR045W/PET494
YDL067C/COX9	YIL125W/KGD1	YOL071W/EMI5
YDL068W	YIL157C/COA1	YOL096C/COQ3
YDL077C/VMA6	YIR021W/MRS1	YOR036W/PEP12
YDL185W/VMA1	YJL046W/RRG3	YOR065W/CYT1
YDR010C	YJL062W-A/RRG10	YOR331C
YDR025W/RPS11A	YJL120W	YOR332W/VMA4
YDR116C/MRPL1	YJL121C/RPE1	YOR350C/MNE1
YDR148C/KGD2	YJL124C/LSM1	YOR358W/HAP5
YDR197W/CBS2	YJL176C/SWI3	YOR380W/RDR1
YDR204W/COQ4	YJL180C/ATP12	YPL031C/PHO85
YDR230W	YJL184W/GON7	YPL045W/VPS16
YDR237W/MRPL7	YJL209W/CBP1	YPL059W/GRX5
YDR269C	YJR040W/GEF1	YPL132W/COX11
YDR271C	YJR077C/MIR1	YPL136W
YDR298C/ATP5	YJR113C/RSM7	YPL189C-A
YDR349C/YPS7	YJR121W/ATP2	YPL188W/POS5
YDR375C/BCS1	YJR122W/CAF17	YPL215W/CBP3
YDR448W/ADA2	YKL016C/ATP7	YPL234C/VMA11
YDR529C/QCR7	YKL055C/OAR1	YPL262W/FUM1
YEL024W/RIP1	YKL119C/VPH2	YPR036W/VMA13
YEL027W/CUP5	YKR085C/MRPL20	YPR066W/UBA3
YEL051W/VMA8	YLL041C/SDH2	YPR099C
YER014C-A/BUD25	YLR038C/COX12	YPR123C
YER017C/AFG3	YLR201C/COQ9	YPR191W/QCR2
YER061C/CEM1	YLR202C	

Class IV *pet* mutants

YAL026C/DRS2	YDL192W/ARF1	YHR009C
YBL031W/SHE1	YDR491C	YLL042C/ATG10
YBL032W/HEK2	YDR523C/SPS1	YLR125W
YBL036C	YER087W	YLR144C/ACF2
YBL046W/PSY4	YER114C/BOI2	YLR260W/LCB5
YBL053W	YER131W/RPS26B	YLR270W/DCS1
YBL057C/PTH2	YER155C/BEM2	YML087C
YBL062W	YGL017W/ATE1	YMR070W/MOT3
YBR128C/ATG14	YGL135W/RPL1B	YMR072W/ABF2
YCL010C/SGF29	YGL165C	YMR077C/VPS20
YCR028C-A/RIM1	YGL206C/CHC1	YNL159C/ASI2
YDL012C	YGL218W	YOR127W/RGA1
YDL056W/MBP1	YGR180C/RNR4	YOR155C/ISN1
YDL091C/UBX3	YGR243W/FMP43	YOR318C
YDL157C	YHR006W/STP2	

Tabelle A4: Gene, die erlässlich für die Respiration sind. Angegeben sind systematische und Standardnamen von Genen. Entsprechende Deletionsmutanten waren in Klasse III enthalten und konnten nach Aufheben der Katabolitrepression auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle wachsen (entnommen aus Merz & Westermann, zur Publikation eingereicht).

YAL009W/SPO7	YDR269C	YJR113C/RSM7
YAL010C/MDM10	YDR271C	YKL055C/OAR1
YAL013W/DEP1	YDR298C/ATP5	YLR038C/COX12
YAL044C/GCV3	YDR349C/YPS7	YML120C/NDI1
YBL082C/ALG3	YDR448W/ADA2	YNL005C/MRP7
YBL093C/ROX3	YER014C-A/BUD25	YNL052W/COX5A
YBR026C/ETR1	YER017C/AFG3	YNL138W/SRV2
YBR097W/VPS15	YGL237C/HAP2	YNL170W
YBR127C/VMA2	YGL244W/RTF1	YNL315C/ATP11
YBR283C/SSH1	YGL251C/HFM1	YNR020C/ATP23
YBR289W/SNF5	YGR155W/CYS4	YOR036W/PEP12
YCL001W-A	YGR262C/BUD32	YOR331C
YCL007C	YHR039C/MSC7	YOR350C/MNE1
YCR020W-B/HTL1	YHR049C-A	YOR380W/RDR1
YCR046C/IMG1	YHR060W/VMA22	YPL031C/PHO85
YDL039C/PRM7	YHR067W/HTD2	YPL045W/VPS16
YDL067C/COX9	YIL125W/KGD1	YPL059W/GRX5
YDL068W	YIL157C/COA1	YPL136W
YDL077C/VMA6	YJL046W/RRG3	YPL188W/POS5
YDL185W/VMA1	YJL120W	YPL215W/CBP3
YDR010C	YJL121C/RPE1	YPL234C/VMA11
YDR025W/RPS11A	YJL124C/LSM1	YPL262W/FUM1
YDR116C/MRPL1	YJL176C/SWI3	YPR066W/UBA3
YDR148C/KGD2	YJL184W/GON7	YPR099C
YDR230W	YJR040W/GEF1	YPR191W/QCR2
YDR237W/MRPL7	YJR077C/MIR1	

Tabelle A5: Gene, die in Klasse I und III-Mutanten unabhängig von der mitochondrialen Proteinexpression für die respiratorische Kompetenz benötigt werden. Aufgeführt sind systematische und Standardnamen der Gene. Angaben zu zellulären Funktionen der Genprodukte stammen aus der SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002) oder manuellen Annotationen (entnommen aus Merz & Westermann, zur Publikation eingereicht).

Genes encoding mitochondrial proteins

YBL045C	COR1, ubiquinol cytochrome c reductase core protein 1
YBL080C	PET112, protein required for mitochondrial translation
YBL099W	ATP1, alpha subunit of F ₁ -ATP synthase
YBR003W	COQ1, catalyzes the first step in ubiquinone (coenzyme Q) biosynthesis
YBR039W	ATP3, gamma subunit of the F ₁ sector of mitochondrial F ₁ F ₀ ATP synthase
YDR204W	COQ4, involved in biosynthesis of coenzyme Q
YDR350C	ATP22, required for assembly of the F ₀ sector of mitochondrial ATP synthase
YDR375C	BCS1, required for expression of functional Rieske iron-sulfur protein
YDR377W	ATP17, ATP synthase subunit f
YDR529C	QCR7, subunit 7 of the ubiquinol cytochrome c reductase complex
YEL024W	RIP1, ubiquinol cytochrome c reductase iron-sulfur protein
YER061C	CEM1, beta-ketoacyl-ACP synthase, mitochondrial
YFL016C	MDJ1, DnaJ co-chaperone involved in mitochondrial biogenesis
YGR062C	COX18, required for activity of mitochondrial cytochrome c oxidase
YGR112W	SHY1, required for assembly of cytochrome c oxidase complex
YJL180C	ATP12, F ₁ -ATP synthase assembly protein
YJR121W	ATP2, beta subunit of F ₁ -ATP synthase
YLL027W	ISA1, mitochondrial protein required for normal iron metabolism
YLL041C	SDH2, iron-sulfur protein subunit of succinat dehydrogenase
YLR201C	COQ9, required for ubiquinone biosynthesis
YLR369W	SSQ1, mitochondrial Hsp70 involved in biogenesis of iron-sulfur proteins
YLR382C	NAM2, leucyl-tRNA synthetase, mitochondrial
YMR035W	IMP2, catalytic subunit of the mitochondrial inner membrane protease Imp
YMR150C	IMP1, catalytic subunit of the mitochondrial inner membrane protease Imp
YMR256C	COX7, cytochrome c oxidase, subunit VII
YMR257C	PET111, required for mitochondrial translation of COX2 mRNA
YNR041C	COQ2, para-hydroxybenzoate-polyprenyltransferase
YOL009C	MDM12, mitochondrial morphology and inheritance protein
YPL013C	MRPS16, mitochondrial ribosomal protein
YPL132W	COX11, required for delivery of copper to Cox1
YPL189C-A	COA2, cytochrome c oxidase assembly factor
YPR067W	ISA2, mitochondrial protein required for iron metabolism

Genes required for vacuolar functions

YEL027W	CUP5, V-ATPase 16 kDa proteolipid subunit of membrane (V ₀) sector
YGR020C	VMA7, V-ATPase 14 kDa subunit of the catalytic (V ₀) sector
YGR105W	VMA21, required for vacuolar V-ATPase assembly
YHR026W	PPA1, V-ATPase proteolipid
YHR039C-B	VMA10, V-ATPase 13 kDa subunit
YKL119C	VPH2, V-ATPase assembly protein
YLR447C	VMA6, V-ATPase 36 kDa subunit
YOR332W	VMA4, V-ATPase hydrophilic subunit (subunit E)
YPR036W	VMA13, V-ATPase 54 kDa subunit of V ₁ sector

Other genes encoding known proteins

YBL021C	HAP3, transcriptional activator of respiratory gene expression
YER070W	RNR1, ribonucleosid-diphosphate-reductase, large (R1) subunit
YGR167W	CLC1, clathrin light chain
YJR122W	CAF17, component of the CCR4 transcription complex
YMR015C	ERG5, C-22 sterol desaturase
YMR021C	MAC1, copper-sensing transcription factor
YOR241W	MET7, required for methionine synthesis and for maintenance of mtDNA
YOR358W	HAP5, transcriptional activator of respiratory gene expression

YOR375C GDH1, NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase

ORFs encoding unknown proteins

YBL100C Dubious open reading frame, overlaps the 5' end of ATP1

YDL129W Unknown function

YDL133W Unknown function

YLL033W RRG4, IRC19, Unknown function

YLR202C Dubious ORF, overlaps with COQ9

YMR151W Dubious ORF, overlaps with IMP1

YNL213C RRG9, Unknown function; protein is detected in highly purified mitochondria

YNR042W Dubious ORF, overlaps with COQ2

YOL071W Unknown function

YOL083W Unknown function

YPR123C Dubious ORF, overlaps with CTR1

Tabelle A6: Gene, die die mitochondriale Funktion möglicherweise in Kombination mit extragenomischen Faktoren beeinflussen. Aufgeführt sind systematische und Standardnamen der Gene, die in Klasse II-Mutanten deletiert sind. Diese Deletionsmutanten können sowohl durch Kreuzung mit $\Delta mip1$ als auch durch Cytoduktion gerettet werden. Angaben zu zellulären Funktionen der Genprodukte stammen aus der SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002) oder manuellen Annotationen (entnommen aus Merz & Westermann, zur Publikation eingereicht).

Genes encoding components involved cytochrome c oxidase assembly

YDL107W	MSS2, involved in membrane insertion of C-terminus of Cox2
YJL003W	COX16, required for assembly of cytochrome c oxidase
YLL018C-A	COX19, required for assembly of cytochrome c oxidase
YPL172C	COX10, required for activity of cytochrome c oxidase

Genes encoding other mitochondrial proteins

YDL033C	SLM3, responsible for 2-thiolation of the wobble base of mitochondrial tRNAs
YEL059C-A	SOM1, subunit of the mitochondrial inner membrane peptidase
YKL040C	NFU1, protein involved in iron metabolism in mitochondria
YML110C	COQ5, involved in ubiquinone (Coenzyme Q) biosynthesis
YOL008W	COQ10, Coenzyme Q (ubiquinone) binding protein
YOR221C	MCT1, putative component of a type-II mitochondrial fatty acid synthase

Genes encoding extramitochondrial proteins

YDL099W	BUG1, Cis-golgi localized protein involved in ER to Golgi transport
YDR270W	CCC2, copper transporting P-type ATPase
YDR364C	CDC40, pre-mRNA splicing factor
YDR458C	HEH2, inner nuclear membrane (INM) protein
YGL070C	RPB9, RNA polymerase II subunit B12.6
YKL080W	VMA5, subunit of the vacuolar V-ATPase
YKL109W	HAP4, global regulator of respiratory gene expression
YLR337C	VRP1, involved in cytoskeletal organization and cytokinesis
YOL051W	GAL11, subunit of the RNA polymerase II mediator complex

Uncharacterized genes

YDL114W	Unknown function
YLR294C	Dubious ORF, partially overlaps with ATP14
YOR200W	Dubious ORF, partially overlaps with MRM1
YOR305W	RRG7, unknown function

Tabelle A7: Die im *MDM33*-Überexpressionsscreen verwendeten 164 Stämme in alphabetischer Reihenfolge, gruppiert anhand der Funktion und Lokalisation ihrer Genprodukte. Aufgeführt sind systematische und Standardnamen der Gene. Angaben zu zellulären Funktionen der Genprodukte stammen aus der SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002) oder manuellen Annotationen. mitochondrial*: Aussage aus GFP-Fusionsstudien (Huh *et al.*, 2003) und/oder Proteomanalysen (Sickmann *et al.*, 2003; Reinders *et al.*, 2006). häufige Standardnamen: AIM: *altered inheritance rate of mitochondria*; FMP: *found in mitochondrial proteome*; MDM: *mitochondrial distribution and morphology*.

UNBEKANNTE PROTEINE (130)

mit Evidenz für mitochondriale Lokalisation (123)

YBL059W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YBL095W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YBR104W	YMC2, mögliche Transport-Aktivität (IM)
YBR163W	DEM1, mitochondriales Protein unbekannter Funktion
YBR230C	OM14, mitochondriales Außenmembranprotein unbekannter Funktion
YBR238C	mitochondriales Membranprotein unbekannter Funktion
YBR262C	AIM5, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YBR269C	FMP21, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YCL005W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YDL027C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YDL157C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YDL203C	ACK1, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YDL222C	FMP45, mitochondriales Membranprotein mit möglicher Beteiligung an Sporulation
YDR049W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YDR061W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YDR065W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YDR070C	FMP16, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YDR185C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion; Ähnlichkeit zu Ups1
YDR493W	FMP36, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YDR514C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YEL030W	ECM10, Protein der Hsp70-Familie; lokalisiert in mtDNA-Nukleoiden
YEL052W	AFG1, Protein der AAA-Familie unbekannter Funktion (Matrixseite der IM)
YEL067C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YER004W	FMP52, mitochondriales Außenmembranprotein unbekannter Funktion
YER077C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YER080W	AIM9, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YER140W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YER182W	FMP10, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YFL046W	FMP32, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YFR011C	AIM13, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YGL057C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YGL080W	FMP37, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YGL085W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YGL139W	FLC3, möglicher FAD-Transporter (auch mitochondrial)
YGL226W	MTC3, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YGR015C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YGR021W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YGR031W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YGR235C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YGR243W	FMP43, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YGR266W	mitochondriales Außenmembranprotein unbekannter Funktion
YHL021C	AIM17, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YHR003C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YHR017W	YSC83, mitochondriales Protein unbekannter Funktion
YHR080C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YHR155W	YSP1, mitochondriales Protein mit möglicher Beteiligung am programmierten Zelltod
YHR162W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion

YHR198C	AIM18, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YHR199C	AIM46, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YIL070C	MAM33, saures Matrix-Protein unbekannter Funktion mit möglicher Beteiligung an der oxidativen Phosphorylierung
YIL077C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YIL087C	LRC2, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YIL136W	OM45, mitochondriales Außenmembranprotein unbekannter Funktion
YJL066C	MPM1, mitochondriales Membranprotein unbekannter Funktion
YJL070C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YJL082W	IML2, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YJL131C	AIM23, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YJL147C	mitochondriales Protein unbekannter Funktion
YJL161W	FMP33, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YJL171C	Zellwandprotein unbekannter Funktion; auch mitochondrial
YJR039W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YJR080C	AIM24, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YJR098C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YJR111C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YKL027W	mitochondriales Außenmembranprotein unbekannter Funktion
YKL070W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YKL162C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YKL187C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YKR016W	AIM28, mitochondriales Protein unbekannter Funktion
YKR023W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YKR027W	FMP50, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YKR049C	FMP46, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YKR070W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YLR077W	FMP25, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YLR091W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YLR164W	mitochondriales Innenmembranprotein unbekannter Funktion
YLR253W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YLR281C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YLR283W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YLR290C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YLR356W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YLR454W	FMP27, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YML030W	AIM31, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YMR003W	AIM34, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YMR031C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YMR097C	MTG1, periphere GTPase der mitochondrialen Innenmembran
YMR115W	MGR3, mitochondriales Protein unbekannter Funktion; möglicherweise beteiligt an mitochondrialem Proteinabbau
YMR157C	AIM36, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YMR221C	FMP42, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion; mögliche Beteiligung an Autophagie
YMR252C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YNL083W	SAL1, mitochondrialer ADP/ATP-Transporter (IM)
YNL100W	AIM37, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YNL122C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YNL144C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YNL168C	FMP41, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YNL195C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YNL200C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YNL211C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YNR018W	AIM38, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YNR040W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YOL053W	AIM39, Protein unbekannter Funktion und Lokalisation
YOR086C	TCB1, mitochondriales* Lipid- und Ca ²⁺ -bindendes Protein unbekannter Funktion
YOR205C	LRC5, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YOR215C	AIM41, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YOR227W	HER1, mitochondriales Protein unbekannter Funktion
YOR228C	mitochondriales Außenmembranprotein unbekannter Funktion

YOR271C	FSF1, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YOR285W	mitochondriales Außenmembranprotein unbekannter Funktion
YOR286W	AIM42, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YOR305W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YPL099C	AIM43, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YPL103C	FMP30, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YPL105C	SHY1, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YPL107W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YPL109C	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YPL137C	GIP3, Glc7-interagierendes Protein unbekannter Funktion (auch mitochondrial)
YPL168W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YPL222W	FMP40, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion
YPL226W	NEW1, mitochondriales* Protein unbekannter Funktion mit ATPase-Aktivität
YPR002W	PDH1, mitochondriales Protein unbekannter Funktion mit Beteiligung an Atmung
YPR097W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion mit Phosphoinositol-Bindungsstelle
YPR098C	mitochondriales Außenmembranprotein unbekannter Funktion
YPR116W	mitochondriales* Protein unbekannter Funktion

ohne Evidenz für mitochondriale Lokalisation (7)

YBR063C	Protein mit unbekannter Funktion und Lokalisation
YDL133W	Protein unbekannter Funktion und Lokalisation
YGL258W	VEL1, Protein unbekannter Funktion und Lokalisation
YIR042C	Protein unbekannter Funktion und Lokalisation
YML002W	Protein unbekannter Funktion und Lokalisation
YMR266W	RSN1, Membranprotein unbekannter Funktion und Lokalisation
YOR114W	Protein unbekannter Funktion und Lokalisation

BEKANNTE MITOCHONDRIALE PROTEINE (34)

mitochondriale Morphologie Komponenten (15)

YBR179C	FZO1, mitochondriale Transmembran-GTPase; mitochondriale Fusion und Erhalt der mitochondrialen Morphologie
YDR150W	NUM1, Kernwanderung; auch mitochondrial; beeinflusst mitochondriale Verteilung und Morphologie
YDR393W	MDM33, mitochondriales Innenmembranprotein erforderlich für normale mitochondriale Morphologie; möglicherweise Innenmembranteilung
YGL219C	MDM34, Protein der mitochondrialen Verteilung und Morphologie (OM)
YHR194W	MDM31, mitochondriales Innenmembranprotein erforderlich für normale mitochondriale Morphologie
YIL065C	FIS1, mitochondriales Außenmembranprotein; mitochondriale Teilung und Erhalt der mitochondrialen Morphologie
YJL112W	MDV1, peripheres mitochondriales Außenmembranprotein; mitochondriale Teilung und Erhalt der mitochondrialen Morphologie
YLL001W	DNM1, Dynamamin-verwandte GTPase; mitochondriale Teilung und Erhalt der mitochondrialen Morphologie (OM-assoziiert)
YLL006W	MMM1, Protein der mitochondrialen Verteilung und Morphologie (OM)
YLR193C	UPS1, alternative Prozessierung und Sorting von Mgm1 (IMS)
YLR368W	MDM30, F-Box-Protein mit Beteiligung an Regulation der mitochondrialen Fusion
YOL009C	MDM12, Protein der mitochondrialen Verteilung und Morphologie (OM)
YOL027C	MDM38, mitochondriales Innenmembranprotein erforderlich für normale mitochondriale Morphologie
YOR147W	MDM32, mitochondriales Innenmembranprotein erforderlich für normale mitochondriale Morphologie
YOR211C	MGM1, mitochondriale GTPase (IMS); mitochondriale Fusion und Erhalt der mitochondrialen Morphologie

Sonstige Funktionen (19)

YBR039W	ATP3, Untereinheit γ des F1-Sektors der F1Fo-ATP-Synthase
YCL044C	MGR1, Untereinheit des i-AAA-Proteasekomplexes der mitochondrialen Innenmembran
YER017C	AFG3, Untereinheit des m-AAA-Proteasekomplexes der mitochondrialen Innenmembran
YFR044C	DUG1, Glutathion-Abbau (auch mitochondrial)

YGL059W	PKP2, mitochondriale Protein-Kinase; Regulation des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes
YGR132C	PHB1, UE des Prohibitin-Komplexes, der im Mitochondrion u.a. Chaperonfunktion übernimmt (IM)
YGR231C	PHB2, UE des Prohibitin-Komplexes, der im Mitochondrion u.a. Chaperonfunktion übernimmt (IM)
YIL042C	PKP1, mitochondriale Protein-Kinase; Regulation des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes
YIL157C	COA1, Assemblierung des Cytochrom c Oxidase-Komplexes (Komplex IV)
YJR144W	MGM101, Komponente des mtDNA-Nukleoids; Erhaltung, Bindung und Reparatur der mtDNA
YKR065C	PAM17, Motoruntereinheit der mitochondrialen Präsequenz-Translokase
YLR201C	COQ9, Ubiquinone (Coenzyme Q)-Biosynthese und respiratorisches Wachstum (Matrixseite der IM)
YLR204W	QRI5, nötig für Akkumulation gesplicerter CoxI-mRNA (IM)
YLR289W	GUF1, mitochondriale Matrix-GTPase mit Beteiligung an Translation
YMR089C	YTA12, Untereinheit des m-AAA-Proteasekomplexes der mitochondrialen Innenmembran
YMR098C	ATP25, Stabilisierung der Oli1p (Atp9p) mRNA und Oli1-Ring-Bildung
YPL271W	ATP15, Untereinheit ϵ des F1-Sektors der F1Fo-ATP-Synthase
YPR024W	YME1, Untereinheit des i-AAA-Proteasekomplexes der mitochondrialen Innenmembran
YPR133W-A	TOM5, Rezeptor-Untereinheit des TOM-Komplexes (OM)

Tabelle A8: Wachstumsverhalten bei Überexpression von *MDM33* laut semiquantitativer Wachstumsanalysen. Aufgeführt sind systematische und Standardnamen der Gene. Gene, die für mitochondriale Morphologiekomponenten kodieren, sind fett markiert. häufige Standardnamen: AIM: *altered inheritance rate of mitochondria*; FMP: *found in mitochondrial proteome*; MDM: *mitochondrial distribution and morphology*.

Wachstumsverschlechterung bei Überexpression von *MDM33* (138)

YBL059W	YHR003C	YLR290C
YBL095W	YHR017W/YSC83	YLR356W
YBR063C	YHR080C	YLR454W/FMP27
YBR104W/YMC2	YHR155W/YSP1	YML002W
YBR163W/DEM1	YHR162W	YMR003W/AIM34
YBR230C/OM14	YHR194W/MDM31	YMR031C
YBR238C	YHR198C/AIM18	YMR115W/MGR3
YBR262C/AIM5	YHR199C/AIM46	YMR157C/AIM36
YBR269C/FMP21	YIL042C/PKP1	YMR221C/FMP42
YCL005W	YIL065C/FIS1	YMR252C
YCL044C/MGR1	YIL070C/MAM33	YMR266W/RSN1
YDL027C	YIL077C	YNL083W/SAL1
YDL203C/ACK1	YIL087C/LRC2	YNL100W/AIM37
YDL222C/FMP45	YIL136W/OM45	YNL122C
YDR049W	YIR042C	YNL144C
YDR065W	YJL066C/MPM1	YNL195C
YDR070C/FMP16	YJL070C	YNL200C
YDR150W/NUM1	YJL082W/IML2	YNL211C
YDR393W/MDM33	YJL112W/MDV1	YNR018W/AIM38
YDR514C	YJL131C/AIM23	YNR040W
YEL030W/ECM10	YJL147C	YOL027C/MDM38
YEL052W/AFG1	YJL161W/FMP33	YOL053W/AIM39
YEL067C	YJL171C	YOR086C/TCB1
YER004W/FMP52	YJR039W	YOR114W
YER077C	YJR080C/AIM24	YOR147W/MDM32
YER080W/AIM9	YJR098C	YOR205C/LRC5
YER140W	YJR111C	YOR215C/AIM41
YER182W/FMP10	YKL027W	YOR227W/HER1
YFL046W/FMP32	YKL070W	YOR228C
YFR011C/AIM13	YKL162C	YOR271C/FSF1
YFR044C/DUG1	YKL187C	YOR285W
YGL057C	YKR016W/AIM28	YOR286W/AIM42
YGL059W/PKP2	YKR023W	YPL099C/AIM43
YGL085W	YKR027W/FMP50	YPL103C/FMP30
YGL139W/FLC3	YKR049C/FMP46	YPL105C/SHY1
YGL219C/MDM34	YKR065C/PAM17	YPL107W
YGL226W/MTC3	YLL001W/DNM1	YPL109C
YGL258W/VEL1	YLR077W/FMP25	YPL137C/GIP3
YGR015C	YLR164W	YPL168W
YGR021W	YLR193C/UPS1	YPL222W/FMP40
YGR031W	YLR201C/COQ9	YPL226W/NEW1
YGR132C/PHB1	YLR204W/QRI5	YPR002W/PDH1
YGR231C/PHB2	YLR253W	YPR024W/YME1
YGR235C	YLR281C	YPR097W
YGR266W	YLR283W	YPR098C
YHL021C/AIM17	YLR289W/GUF1	YPR133W-A/TOM5

Gleichbleibendes oder verbessertes Wachstum bei Überexpression von *MDM33* (14)
(kursiv: nach Tüpfeltest als allgemein wachstumsbeeinträchtigt zu werten; unterstrichen:
auch laut Tüpfeltests noch Wachstumsverbesserung im Vergleich zum Wildtyp; Abb. A1)

YBR039W/ATP3
YBR179C/FZO1
YDR061W
YDR185C
YDR493W/FMP36

YER017C/AFG3
YGL080W/FMP37
YIL157C/COA1
YKR070W
YLR091W

YML030W/AIM31
YMR089C/YTA12
YNL168C/FMP41
YPL271W/ATP15

Wachstumsdefekt bereits ohne Überexpression von *MDM33* (12)

YDL133W
YDL157C
YGR243W/FMP43
YJR144W/MGM101

YLL006W/MMM1
YLR368W/MDM30
YMR097C/MTG1
YMR098C/ATP25

YOL009C/MDM12
YOR211C/MGM1
YOR305W
YPR116W

Tabelle A9: Ergebnisse aus bioinformatischen Strukturvorhersagen und Datenbankrecherchen. Angegeben sind systematische und Standardnamen der Gene gemäß der *Saccharomyces* Genome Database (SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002), die Größe der kodierten Proteine in Aminosäuren (AS) sowie errechnete Transmembranandomänen (TM; Hofmann & Stoffel, 1993), Coiled-coil-Strukturen (CC; Lupas *et al.*, 1991) und mitochondriale Präsequenzen mit entsprechendem „score“ (Claros & Vincens, 1996). Außerdem wurden Daten aus der Proteindatenbank PFAM (Finn *et al.*, 2008), Evidenz für mitochondriale Lokalisation, die Verbreitung von Proteinhomologen sowie publizierte genetische und physiologische Interaktionen zusammengefasst. Informationen hierfür entstammen der SGD sowie GFP-Fusionsstudien nach (1) Huh *et al.* (2003) und/oder aus Proteomanalysen nach (2) Sickmann *et al.* (2003) und (3) Reinders *et al.* (2006). Positive aus den Wachstumsanalysen sind unterstrichen und Positive aus den Mitochondrienstudien sind nicht-unterstrichen dargestellt. YML030W (fett) wurde in beiden Herangehensweisen identifiziert.

Systematischer und Standard-name	Größe in Da	TMs	CCs	mitochondriale Präsequenz (score)	PFAM-Daten	Evidenz für mitochondriale Lokalisation	Homologe in	genetische oder physiologische Interaktionen
<u>YBR163W;</u> <u>DEM1</u>	67,569	1x	1x	ja (0,793)	"Defects in morphology"-Protein	(1)	Archea, Asco- und Basidiomyceten sowie Pflanzen und Tieren	Synthetische Beziehung zu Act1 (Aktin) und Jnm1 (Komponente des Hefe Dynaktin-Komplexes)
<u>YDR061W</u>	61,191	nein	1x	ja (0,747)	ABC-Transporter	(1) + (3)	Eubakterien und Reis	mit DNA-Reparatur-Komponenten und Kinetochor
<u>YER004W;</u> <u>FMP52</u>	25,086	1x	nein	evtl. (0,5608)	NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase Familie; HIM1	(1) + (2) + (3)	Archea und Eubakterien	2 P-Typ ATPasen, RNA-Polymerase und Anaphase Promoting Complex
<u>YGL080W;</u> <u>FMP37</u>	14,995	2x	nein	ja (0,9132)	MtN3/saliva-Familie (Transmembranproteine)	(1) + (2) + (3)	Pilzen, Tieren und Pflanzen	keine
<u>YLR091W;</u> <u>RRG5</u>	33,868	nein	1x	keine	C-Terminus Lactococcus lactis-Familie	(1) + (2) + (3)	nur in Pilzen	keine
YLR356W	20,4	4x	nein	evtl. (0,4479)	keine Angaben	(1)	Ascomyceten	5 verschiedene; kein Muster erkennbar; u.a. Mlc1 über Affinity Capture
YML030W; AIM31	18,477	2x	1x	keine	Hypoxia induziertes Protein	(1) + (2) + (3)	Eubakterien, Asco- und Basidiomyceten sowie Pflanzen und Tieren	genet. Interaktion mit 16 verschiedenen Proteinen; kein Muster feststellbar

Tabelle A10: Mitochondriale Morphologie bei Überexpression von *MDM33*. Angegeben sind systematische und Standardnamen der Gene. Gene, die für mitochondriale Morphologiekomponenten kodieren, sind fett markiert. häufige Standardnamen: AIM: *altered inheritance rate of mitochondria*; FMP: *found in mitochondrial proteome*; MDM: *mitochondrial distribution and morphology*.

Fragmentierung der Mitochondrien bei Überexpression von *MDM33* (130 Stämme)

YBL059W	YHL021C/AIM17	YLR289W/GUF1
YBL095W	YHR003C	YLR290C
YBR063C	YHR017W/YSC83	YLR454W/FMP27
YBR104W/YMC2	YHR080C	YML002W
YBR230C/OM14	YHR155W/YSP1	YMR003W/AIM34
YBR238C	YHR162W	YMR031C
YBR262C/AIM5	YHR198C/AIM18	YMR115W/MGR3
YBR269C/FMP21	YHR199C/AIM46	YMR157C/AIM36
YCL005W	YIL042C/PKP1	YMR221C/FMP42
YCL044C/MGR1	YIL065C/FIS1	YMR252C
YDL027C	YIL070C/MAM33	YMR266W/RSN1
YDL203C/ACK1	YIL077C	YNL083W/SAL1
YDL222C/FMP45	YIL087C/LRC2	YNL100W/AIM37
YDR049W	YIL136W/OM45	YNL122C
YDR150W/NUM1	YIR042C	YNL144C
YDR185C	YJL066C/MPM1	YNL195C
YDR393W/MDM33	YJL070C	YNL200C
YDR514C	YJL131C/AIM23	YNL211C
YEL030W/ECM10	YJL147C	YNR018W/AIM38
YEL052W/AFG1	YJL161W/FMP33	YNR040W
YEL067C	YJL171C	YOL027C/MDM38
YER077C	YJR039W	YOL053W/AIM39
YER080W/AIM9	YJR080C/AIM24	YOR086C/TCB1
YER140W	YJR098C	YOR114W
YER182W/FMP10	YJR111C	YOR205C/LRC5
YFL046W/FMP32	YJR144W/MGM101	YOR215C/AIM41
YFR011C/AIM13	YKL027W	YOR227W/HER1
YFR044C/DUG1	YKL070W	YOR228C
YGL057C	YKL162C	YOR271C/FSF1
YGL059W/PKP2	YKL187C	YOR285W
YGL080W/FMP37	YKR016W/AIM28	YOR286W/AIM42
YGL085W	YKR023W	YPL099C/AIM43
YGL139W/FLC3	YKR027W/FMP50	YPL103C/FMP30
YGL219C/MDM34	YKR049C/FMP46	YPL105C/SHY1
YGL226W/MTC3	YKR065C/PAM17	YPL107W
YGL258W/VEL1	YKR070W	YPL109C
YGR015C	YLR077W/FMP25	YPL168W
YGR021W	YLR164W	YPL222W/FMP40
YGR031W	YLR193C/UPS1	YPL226W/NEW1
YGR132C/PHB1	YLR204W/QRI5	YPR002W/PDH1
YGR231C/PHB2	YLR253W	YPR097W
YGR235C	YLR281C	YPR098C
YGR266W	YLR283W	YPR133W-A/TOM5

Bereits vor Überexpression mit überexpressionsähnlichen Mitochondrien (29 Stämme)

YBR039W/ATP3
YBR179C/FZO1
YDL133W
YDL157C
YDR061W
YDR065W
YDR070C/FMP16
YDR493W/FMP36
YER017C/AFG3
YGR243W/FMP43

YHR194W/MDM31
YIL157C/COA1
YJL082W/IML2
YLL001W/DNM1
YLL006W/MMM1
YLR091W
YLR201C/COQ9
YLR368W/MDM30
YMR089C/YTA12
YMR097C/MTG1

YMR098C/ATP25
YNL168C/FMP41
YOL009C/MDM12
YOR147W/MDM32
YOR211C/MGM1
YOR305W
YPL137C/GIP3
YPL271W/ATP15
YPR024W/YME1
YPR116W

Anwesenheit wildtypischer Mitochondrien bei Überexpression von *MDM33* (5 Stämme)

YBR163W/DEM1
YER004W/FMP52

YJL112W/MDV1
YLR356W

YML030W/AIM31

Abbildung A1: Tüpfeltests zu den Stämmen mit gleichbleibend gutem Wachstum in semiquantitativen Analysen. Fünf Deletionsstämme (roter Stern) zeigen in Tüpfeltest bei Überexpression von *MDM33* besseres Wachstum als der Wildtyp. Von Zellkulturen, die über Nacht in SD-Medium bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 angezogen worden waren, wurden serielle Verdünnungen auf SD- und SGal-Platten aufgetropft und drei Tage bei 30°C inkubiert. Die SD-Platten belegen vergleichbare Zellkonzentration und -fitness.

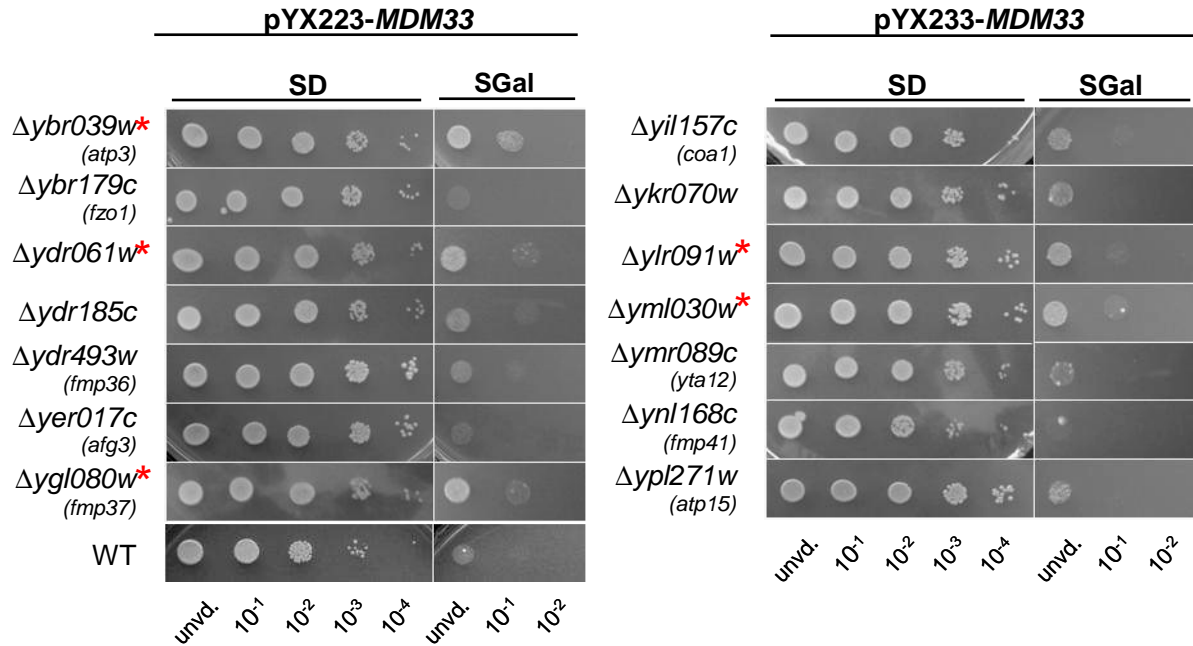
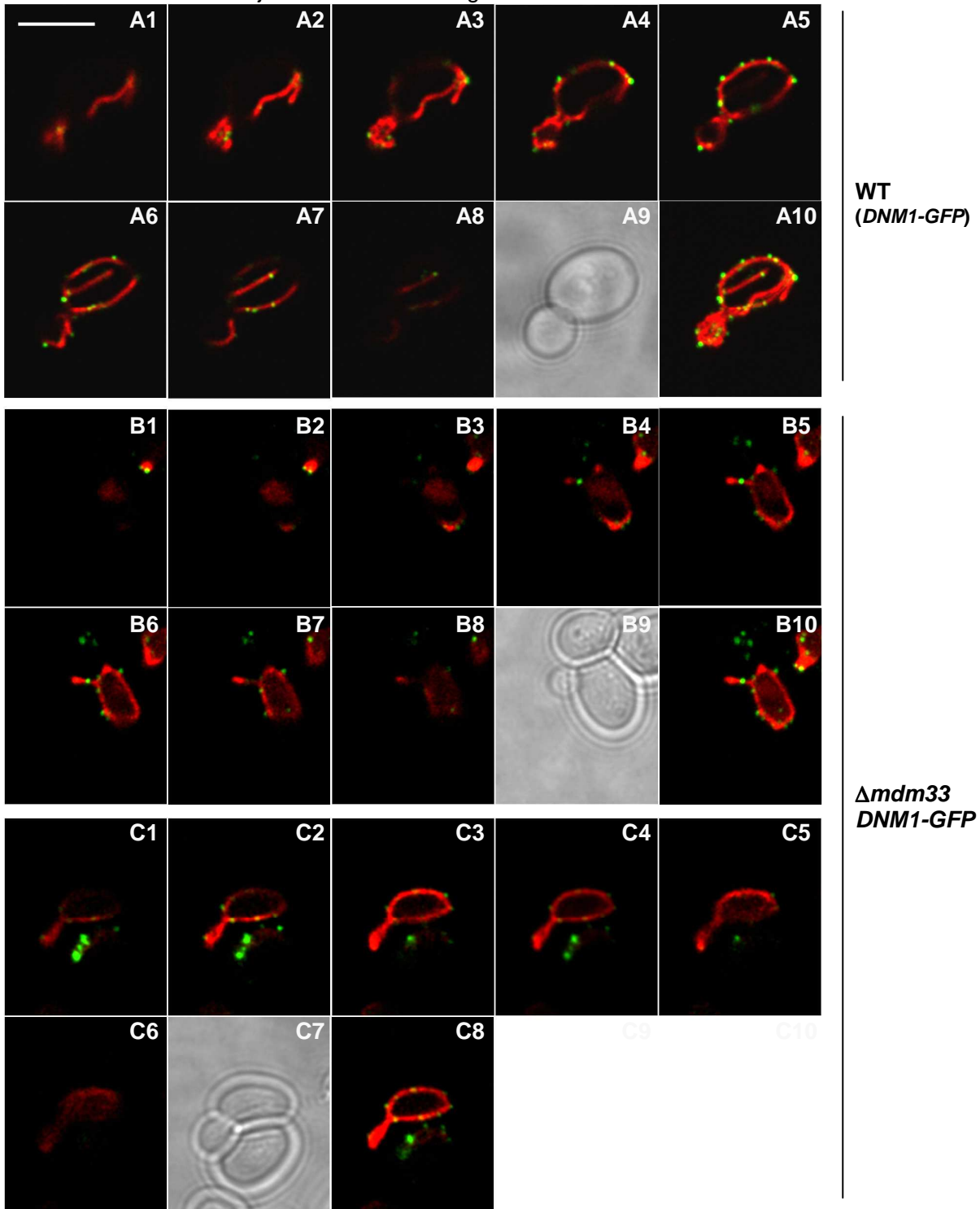


Abbildung A2: Konfokale Analysen der mitochondrialen Morphologie und Lage der Dnm1-GFP-Cluster.

Die Zellen wurden über Nacht bei 30°C in flüssigem YPGal-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Der Größenbalken gilt für alle Bilder und entspricht 5 µm. Jede Serie besteht aus Überlagerungen der mtRFP und Dnm1-GFP-Fluoreszenz in verschiedenen optischen Zellebenen (x/y) (A/B1-8 und C1-6), einer Phasenkontrastaufnahme (A/B9 und C7) und einer *Maximum Intensity Projektion* (A/B10 und C8) der Fluoreszenzbilder. (A) Aufnahmen einer Wildtypzelle. Der Stapel umfasst ~2,6 µm. Der Abstand zwischen den seriellen Einzelaufnahmen A1-A8 beträgt jeweils 366 nm. (B) und (C) Aufnahmen von $\Delta mdm33$ -Zellen mit schüsselförmigen Mitochondrien. Der Stapel (B) umfasst ~2,7 µm. Die Abstände zwischen den seriellen Einzelaufnahmen B1-B8 betragen je 396 nm. Der Stapel (C) umfasst ~ 1,8 µm, wobei der Abstand zwischen den seriellen Einzelaufnahmen C1-C6 jeweils 366 nm beträgt.



Im Rahmen der Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

- Dürr, M., Escobar-Henriques, M., Merz, S., Geimer, S., Langer, T., Westermann, B. (2006) Nonredundant roles of mitochondria-associated F-box proteins Mfb1 and Mdm30 in maintenance of mitochondrial morphology in yeast. *Mol Biol Cell* 17, 3745-55.
- Merz, S., Hammermeister, M., Altmann, K., Dürr, M. und Westermann, B. (2007). Molecular machinery of mitochondrial dynamics in yeast. *Biol Chem* 388, 917-926.
- Merz, S. und Westermann, B. (2009). Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol* 10, R95.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Januar 2005 und April 2009 am Institut für Zellbiologie der Universität Bayreuth. Bei Herrn Prof. Dr. Benedikt Westermann möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die Arbeit dort anzufertigen. Danke auch für die gute Betreuung, die zahlreichen Hilfestellungen und Anregungen sowie das große Verständnis besonders während der Endphase meiner Dissertation.

Außerdem möchte ich mich bei unserer Technischen Assistentin, Annette Suske, für eine reibungslose Versorgung mit allen Arbeitsmaterialien bedanken. Ein großes Dankeschön auch an Petra Helies, die den Arbeitsalltag mit guter Laune stets auflockerte und dafür sorgte, dass immer saubere Röhrchen und Kölbchen vorhanden waren. Besonderer Dank gilt auch Rita Grotjahn und Dr. Stefan Geimer für die geduldige Einführung in und die große Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Vielen Dank an Dr. Stefan Heidmann und Prof. Dr. Olaf Stemmann für die Nutzung des konfokalen Fluoreszenzmikroskops.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Lehrstuhls (es würde bei weitem zu weit führen euch alle namentlich zu erwähnen, sorry) danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, den fachlichen Rat, die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und immer genügend Kuchen. Es hat mir sehr viel Spaß gemacht mit euch zusammen zu arbeiten. Speziell hervorheben möchte ich Beatrix Löwer und Melanie Krist, die im Rahmen ihrer Vertiefungspraktika Beiträge zu einigen Experimenten leisteten, und Miriam Hammermeister und Mark Dürr, die mich während meiner ganzen Zeit am Lehrstuhl begleiteten, mit mir durch Höhen und Tiefen gingen, immer mit Rat und Tat zur Seite standen und mehr als nur Arbeitskollegen wurden. Vielen Dank zusätzlich an Miriam für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Arbeit.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Antonia Post, die immer ein offenes Ohr für mich und meine Problemchen hat und besonders in den Tiefphasen meiner Arbeit eine große Stütze für mich war.

Anne-Juliane Geitner danke ich für ihre liebe, optimistische Art, die aufmunternden Worte und die gelegentliche Ablenkung vom Laboralltag.

Herzlicher Dank gilt auch meinen lieben Eltern, die mir das Studium erst ermöglichten und mich vielfältig unterstützt haben.

Der größte Dank gilt dem besten Ehemann von allen, Roman Jakob, der besonders im letzten Jahr keinen leichten Stand hatte. Es war großartig, wie sehr du mich unterstützt, mit welcher unendlichen Geduld und Kraft du immer wieder meine Launen und Stimmungsschwankungen ertragen und mich stets ermutigt hast, die Arbeit zu Ende zu bringen. Danke, dass du immer an mich glaubst und mir das Gefühl gibst, etwas im Leben richtig zu machen.

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Sandra Merz-Jakob

Bayreuth, den 28.04.2009